

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Mise au point d'un modèle de carcinome spinocellulaire au sein d'un environnement épidermique dans le cadre de l'étude de la podoplanine dans des kératinocytes cancéreux

SQUILBECK , Joséphine

*Award date:*  
2014

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

**MISE AU POINT D'UN MODELE DE CARCINOME SPINOCELLULAIRE AU SEIN  
D'UN ENVIRONNEMENT EPIDERMIQUE DANS LE CADRE DE L'ETUDE DE LA  
PODOPLANINE DANS DES KERATINOCYTES CANCEREUX**

**Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Joséphine Squilbeck

Janvier 2014



**Mise au point d'un modèle de carcinome spinocellulaire au sein d'un  
environnement épidermique dans le cadre de l'étude de la podoplanine dans des  
kératinocytes cancéreux**

Squillbeck Joséphine

Résumé

La podoplanine, glycoprotéine transmembranaire de type mucine, est surexprimée dans de nombreux cancers dont le carcinome spinocellulaire épidermique. Les modes d'actions de cette protéine dans la tumorigenèse ne sont pas précisément connus. Elle interviendrait notamment dans l'agrégation plaquettaire, dans la migration cellulaire par modulation du cytosquelette, ainsi que dans l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse.

L'objectif de ce mémoire est l'élaboration d'un modèle de carcinome spinocellulaire au sein d'un environnement épidermique pour étudier le rôle de la podoplanine dans les kératinocytes cancéreux.

Dans une première partie, nous avons caractérisé l'expression de la podoplanine *in vivo* et *in vitro*. *In vivo*, la podoplanine n'est pas détectée dans la peau humaine normale. Dans un modèle de culture *in vitro* en monocouche, les résultats d'analyse de l'expression de l'ARN messager et de l'abondance protéique ont démontré la capacité des kératinocytes normaux à exprimer la podoplanine de manière inversement dépendante de la confluence. Lors du processus de reconstruction d'épidermes reconstruits *in vitro*, la podoplanine est détectée au niveau de la couche basale du tissu.

Nous avons également caractérisé l'expression de la podoplanine du point de vue de l'ARN messager et de l'abondance protéique dans les cellules A431, lignée cellulaire issue d'un carcinome spinocellulaire épidermique. La podoplanine est également exprimée dans ces cellules, de manière variable selon les conditions de culture.

Dans une seconde partie, nous avons élaboré deux modèles de coculture de kératinocytes normaux et de cellules A431 GFP-positives : la monocouche et l'épiderme reconstruit *in vitro*. Ces modèles permettent la visualisation aisée des cellules cancéreuses parmi les kératinocytes normaux, par microscopie à fluorescence. Enfin, nous avons évalué les potentialités du modèle en étudiant l'influence de conditions environnementales sur la population de cellules A431 parmi les kératinocytes normaux. Dans le futur, ces deux modèles nous permettront d'étudier le rôle de la podoplanine dans les kératinocytes cancéreux.





## ***Remerciements***

Au terme de ces 10 mois de mémoire, je tiens à remercier plusieurs personnes.

Je remercie Yves Poumay et Catherine Lambert pour leur aide et leurs conseils.

Je tiens à dire un immense merci à Maryse Hermant pour son aide et ses précieux conseils tout au long de ce mémoire, qui m'ont permis d'aboutir à ce travail.

Je remercie Jérémy pour tous ses conseils pratiques, ainsi que son aide pour les statistiques

Je remercie également tous les membres du LabCeti pour leur bonne humeur et leur présence durant ce mémoire

Merci également à Annie Degen, Caroline Canon et Patrick Glesner pour leur bonne humeur.

J'en profite également pour remercier mes amis et ma famille pour leur soutien durant ce mémoire et ces 5 années d'études !

Merci à tous !



## TABLE DES MATIERES

### INTRODUCTION

1	La peau .....	1
1.1	Histologie de la peau .....	1
1.2	L'épiderme .....	1
1.3	Le kératinocyte et la différenciation .....	2
2	Le cancer-généralités .....	3
3	Les cancers de l'épiderme .....	4
3.1	Généralités .....	4
3.2	Le carcinome basocellulaire .....	4
3.3	Le carcinome spinocellulaire .....	5
3.4	Le mélanome .....	6
3.5	Les modèles d'étude du carcinome spinocellulaire .....	7
4	La podoplanine .....	8
4.1	Introduction .....	8
4.2	Fonctions .....	9
4.3	Structure et régulation .....	9
4.4	Interactions et mécanismes d'action .....	10
4.5	Podoplanine et cancer .....	10
5	La culture de kératinocytes .....	13
5.1	La culture en monocouche .....	13
5.2	La culture en trois dimensions: l'épiderme humain reconstruit .....	13
6	Objectifs du mémoire .....	15

### MATERIEL ET METHODES

1	Cultures de kératinocytes humains normaux et cancéreux .....	17
1.1	Culture de kératinocytes humains normaux .....	17
1.1.1	<i>Culture primaire</i> .....	17
1.1.2	<i>Culture secondaire</i> .....	18
1.1.3	<i>Culture tertiaire = culture en monocouche</i> .....	18



1.1.4	<i>Culture en épiderme reconstruit humain (RHE, reconstructed human epidermis)</i> .....	18
1.2	Culture de kératinocytes humains cancéreux .....	18
1.3	Coculture de kératinocytes cancéreux et normaux .....	19
1.3.1	<i>Production de kératinocytes cancéreux GFP-positifs</i> .....	19
1.3.2	<i>Modèle de coculture en monocouche</i> .....	19
1.3.3	<i>Modèle de tumeurs épidermiques dans un épiderme reconstruit</i> .....	19
2	Traitement des kératinocytes.....	19
2.1	Traitement des kératinocytes par l'EGF (epidermal growth factor).....	19
2.2	Traitement des kératinocytes par des inhibiteurs du récepteur de l'EGF .....	20
3	Quantification du matériel cellulaire vivant.....	20
3.1	Test MTT.....	20
3.2	Comptage cellulaire.....	21
4	Analyse de l'expression de l'ARN messager par PCR quantitative en temps réel.....	21
4.1	Extraction de l'ARN.....	21
4.2	Rétro-transcription.....	22
4.3	PCR en temps réel .....	22
5	Analyse de l'abondance protéique par Western blot .....	22
5.1	Extraction des protéines .....	23
5.2	Western blot .....	23
6	Préparation des échantillons pour la microscopie.....	23
6.1	Marquage par réaction immunoperoxydasique .....	23
6.2	Marquage par immunofluorescence .....	24
6.3	Préparation des tissus entiers pour la microscopie confocale.....	25
6.4	Préparation des cultures pour l'analyse au BD pathway .....	25

## RESULTATS

1	Caractérisation de l'expression de la podoplanine.....	27
1.1	Caractérisation de l'expression de la podoplanine en condition normale .....	27
1.1.1	<i>Détection de la podoplanine in vivo dans la peau humaine</i> .....	27
1.1.2	<i>Détection de la podoplanine dans des kératinocytes normaux en culture</i> .....	27
1.1.3	<i>Caractérisation de l'expression de la podoplanine dans des épidermes reconstruits</i> .....	28
1.2	Caractérisation de l'expression de la podoplanine dans des cellules cancéreuses .....	29



1.2.1	<i>Caractérisation de l'expression de la podoplanine in vivo dans des carcinomes spinocellulaires</i>	29
1.2.2	<i>Caractérisation de l'expression de la podoplanine dans des kératinocytes cancéreux en culture</i>	29
2	<b>Elaboration d'un modèle de carcinome spinocellulaire dans un environnement épidermique</b>	31
2.1	<b>Description du modèle</b>	31
2.1.1	<i>Modèle de coculture en monocouche</i>	31
2.1.2	<i>Modèle de coculture en épiderme reconstruit</i>	32
2.2	<b>Mise au point du modèle de coculture</b>	33
2.2.1	<i>Etude de l'influence de l'EGF sur la population cellulaire</i>	33
2.2.2	<i>Etude de l'influence d'inhibiteurs du récepteur de l'EGF sur la population cellulaire</i>	34

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

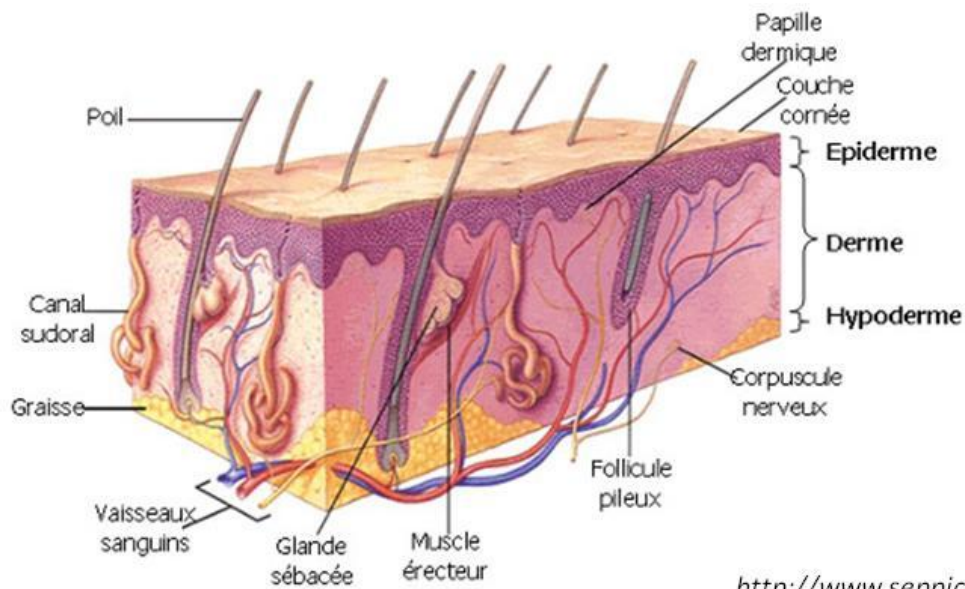
1	<b>Caractérisation de l'expression de la podoplanine dans les kératinocytes normaux et cancéreux</b>	37
2	<b>Élaboration d'un modèle de carcinome spinocellulaire au sein d'un environnement épidermique</b>	39
3	<b>Perspectives</b>	41

## BIBLIOGRAPHIE

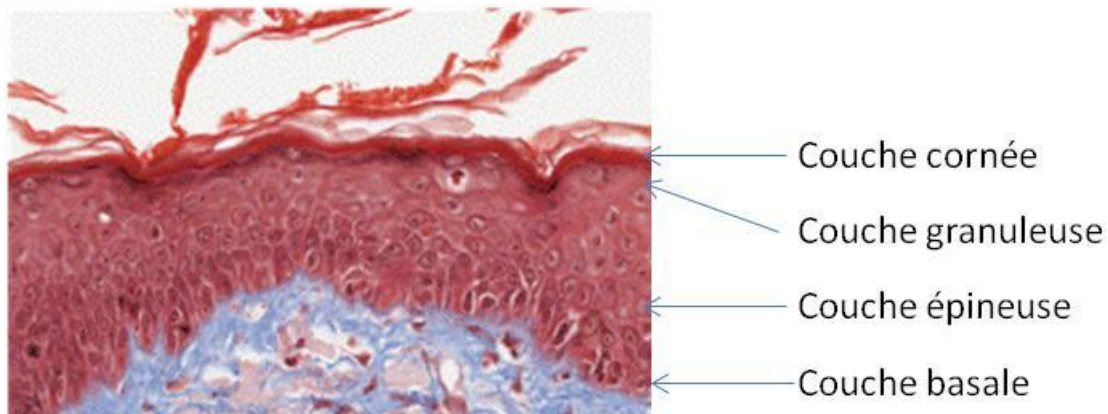




# Introduction



**Figure 1.1 : Représentation schématique de la peau humaine.** La peau est constituée de trois tissus : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.



*Histology.be*

**Figure 1.2 : Couches de l'épiderme.** L'épiderme est un épithélium pluristratifié constitué de quatre couches ; la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée.

# 1 La peau

La peau, un des organes les plus volumineux de notre organisme, recouvre toute notre surface corporelle et s'étend sur une superficie de  $1.7\text{m}^2$  environ. La peau est un organe très important puisqu'une de ses principales fonctions est d'agir comme une barrière. En effet, la peau permet la protection de l'organisme à la fois contre la déshydratation et la perte d'ions, mais également contre des agents extérieurs agressifs tels que des microorganismes ou même contre l'exposition aux rayons ultraviolets. Outre ce rôle de barrière, la peau participe également à la thermorégulation grâce à la présence du tissu adipeux, des poils et des glandes sudoripares ; à la sensation, au moyen de nombreuses terminaisons nerveuses ; ainsi qu'au métabolisme de l'organisme en participant notamment à la synthèse de vitamine D.

## 1.1 Histologie de la peau

La peau est constituée de trois tissus : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (*figure 1.1*).

**L'hypoderme**, couche la plus interne, est principalement constitué de tissu conjonctif riche en adipocytes. Sa principale fonction est d'intervenir dans la thermorégulation de l'organisme, dans le stockage d'énergie sous forme de triglycérides, mais également dans la protection contre les chocs mécaniques.

Le **derme**, couche intermédiaire, est constitué de tissu conjonctif riche en fibres de collagène et élastiques permettant la résistance face à des forces de traction et l'élasticité de la peau. Le derme comporte également différentes structures épithéliales dont les follicules pileux, les glandes sébacées, les glandes sudoripares, ainsi que des terminaisons sensorielles.

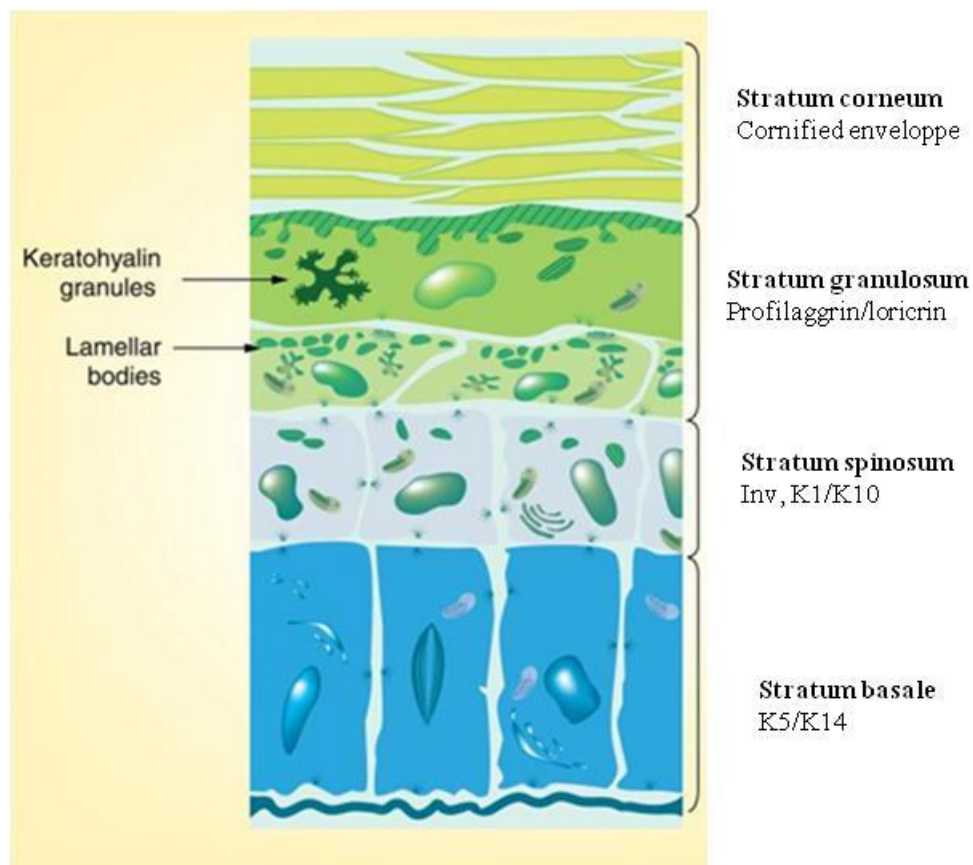
**L'épiderme**, couche la plus externe, est un épithélium pluristratifié complexe dans lequel les kératinocytes, type cellulaire majoritaire, subissent un processus de différenciation régulé depuis la base du tissu jusqu'à la surface. Ce tissu est constitué de quatre couches : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée.

L'épiderme est lié au derme grâce à une structure d'ancrage spéciale appelée **jonction épidermo-dermique**, qui joue un rôle dans le maintien de la peau et la protection contre les forces mécaniques. Au niveau de cette jonction, se trouve une lame basale constituée de trois couches : la lamina lucida, la lamina densa et la lamina sub-basale. En outre, de nombreux hémidesmosomes ainsi que des filaments d'ancrage situés au niveau de cette jonction permettent de renforcer l'adhérence de l'épiderme sur le derme.

## 1.2 L'épiderme

Comme décrit précédemment, l'épiderme est un épithélium pluristratifié constitué de différentes couches (*figure 1.2*) :

La **couche basale** ou assise germinative est une couche simple constituée de kératinocytes de forme cylindrique ou cubique, aux noyaux ovalaires et aux cytoplasmes basophiles. Ces cellules sont ancrées à la lame basale par des hémidesmosomes et accrochées les unes aux autres grâce à des desmosomes. Les kératinocytes de la couche basale ont généralement un taux élevé de prolifération. En effet, le maintien de la population cellulaire épidermique ne se réalise qu'au niveau de cette couche et c'est par une différenciation ultérieure des kératinocytes que se forment les autres couches de l'épiderme.



(Adapted from Bikle *et al* 2012)

**Figure 1.3 : Marqueurs de différenciation des kératinocytes.** Les kératinocytes de la couche basale expriment les kératines 5 et 14 (K5/K14). Dans la couche épineuse, ce sont les kératines 1 et 10 (K1/K10) qui sont exprimées. C'est également dans cette couche que commence à être exprimée l'involucrine (Inv). Les kératinocytes de la couche granuleuse expriment la profilaggrine, précurseur de la filaggrine, et la loricrine.

La ***couche épineuse*** est constituée de plusieurs couches de cellules polyédriques ayant des morphologies différentes et présentant des noyaux centraux arrondis et des cytoplasmes clairs. Ces cellules sont maintenues entre elles par la présence de nombreux desmosomes.

La ***couche granuleuse*** est constituée de cellules plus allongées dans lesquelles sont présents des grains de kératohyaline contenant principalement un précurseur de la filaggrine. On y retrouve les « corps d'Odland » ou corps lamellaires dont le contenu lipidique est déversé dans l'espace intercellulaire entre la couche granuleuse et la couche cornée.

La ***couche cornée***, couche la plus externe et la plus superficielle, est constituée de kératinocytes morts, ayant perdu leur noyau et chargés en filaments intermédiaires de kératines, appelés cornéocytes qui seront éliminés en surface par la desquamation.

L'épiderme est constitué principalement de kératinocytes mais il contient d'autres types cellulaires : les cellules de Merkel, les cellules de Langerhans et les mélanocytes.

Les **cellules de Merkel**, présentes dans la couche basale, font partie du système neuroendocrinien et interviennent dans la sensation et la mécano-perception.

Les **mélanocytes**, également présents au niveau de la couche basale, sont les cellules pigmentaires permettant la production de mélanine, composant responsable de la pigmentation et assurant la protection de l'ADN contre les rayons ultraviolets.

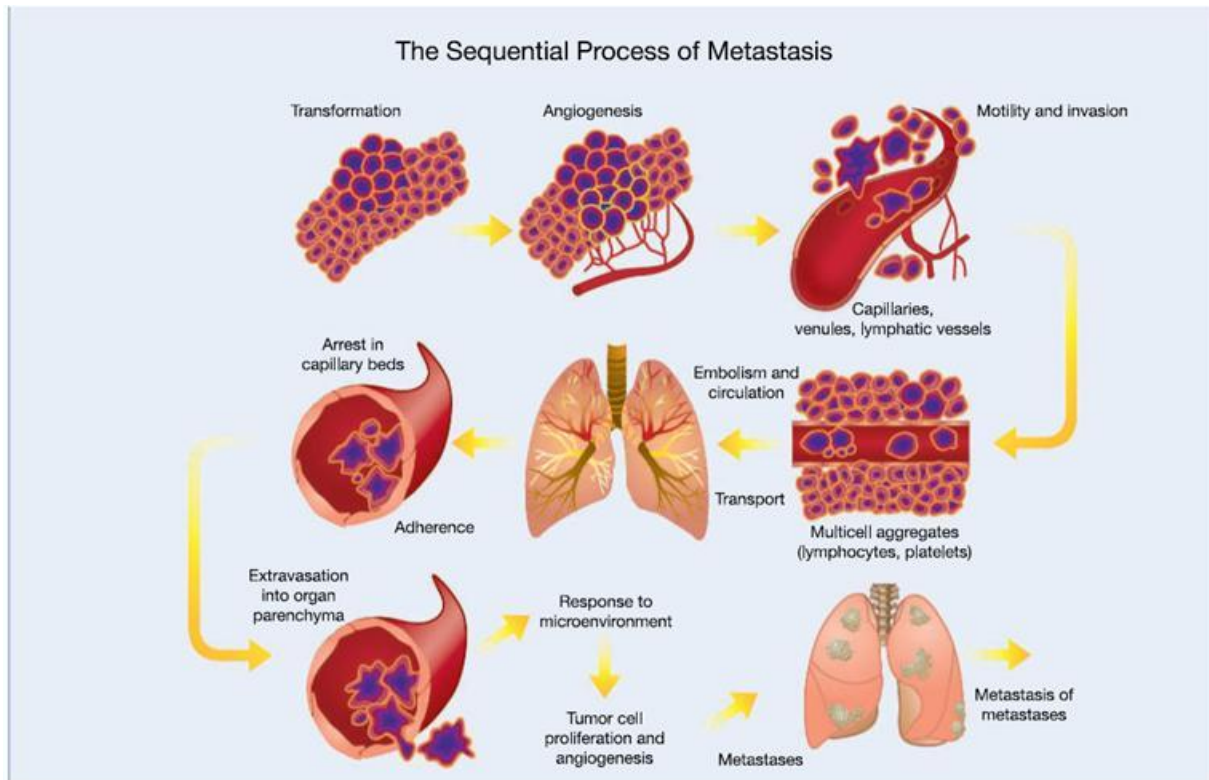
Les **cellules de Langerhans**, cellules dendritiques, interviennent dans la réponse immunitaire car ce sont des cellules présentatrices d'antigènes.

### 1.3 Le kératinocyte et la différenciation

Le kératinocyte, type cellulaire majeur de l'épiderme, constitue près de 90% de cet épithélium. Comme en témoigne son nom, cette cellule produit des kératines, protéines fibreuses qui jouent un rôle dans le maintien de l'imperméabilité de la peau et dans la protection de celle-ci.

Ces kératinocytes vont subir un processus de différenciation. En effet, dans la couche basale, ils montrent généralement un taux de prolifération élevé, cependant, lorsqu'ils se détachent de la lame basale et migrent vers les couches supérieures, ils subissent une différenciation progressive, jusqu'à la desquamation au niveau de la couche cornée. Lors de cette différenciation, différentes protéines qui interviennent dans ce processus sont exprimées. Ces protéines sont, pour cette raison, appelées **marqueurs de différenciation**.

Au niveau de la couche basale, les kératinocytes en prolifération expriment les kératines 5 et 14. Ces kératines sont considérées comme des marqueurs de kératinocytes prolifératifs et peu ou pas différenciés. Lorsque les cellules ont une localisation suprabasale, au niveau de la couche épineuse, elles ne sont plus en contact avec la lame basale, et les kératines 5 et 14 sont remplacées par les kératines 1 et 10 qui sont considérées comme des marqueurs de différenciation précoce. C'est également dans la couche épineuse que commence à être exprimée l'involucrine, précurseur de la couche cornée. Pour terminer, les kératinocytes de la couche granuleuse expriment la profilaggrine et la loricine qui sont donc des marqueurs de différenciation tardive (*figure 1.3*). (Eckert and Rorke 1989; Poumay and Pittelkow 1995; Bikle, Xie et al. 2012).



(Talmadge and Fidler 2010)

**Figure 2.1 : Processus de formation de métastases.** Une cellule tumorale de la tumeur primaire peut se détacher et parvenir à rejoindre la circulation sanguine ou lymphatique. Elle sera transportée dans la circulation jusqu'à l'arrêt dans un capillaire d'un autre organe. La cellule sera ensuite capable de sortir de la circulation (extravasation) et d'envahir le nouveau tissu.

## 2 Le cancer-généralités

Le cancer est la deuxième cause de mortalité dans le monde et constitue donc une préoccupation sanitaire importante pour la population. Un cancer se développe généralement suite à un défaut de régulation de la prolifération cellulaire. En effet, les cellules capables de proliférer sont soumises à différents signaux qui permettent la régulation de la prolifération cellulaire. Cependant lorsque les cellules sont soumises à des agents cancérogènes comme l'exposition à des radiations ionisantes ou à certaines substances chimiques, des dommages à l'ADN sont générés. Dans le cas d'un fonctionnement normal, lorsqu'une cellule a subi des dommages dans son ADN, un système de réparation intervient, entraînant éventuellement l'arrêt du cycle cellulaire et même l'apoptose de cette cellule en cas de dommages irréparables. Cependant, si les dommages à l'ADN touchent des gènes responsables de la régulation du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN, celles-ci ne pourront plus se faire. La cellule entre alors dans un processus où elle ne répond plus aux signaux de régulation, ce qui entraîne une prolifération incontrôlée de la cellule pouvant conduire à la formation d'une tumeur.

Les cellules tumorales parviennent à échapper aux systèmes de défense mis en place par l'organisme grâce à l'élaboration de nombreux mécanismes favorisant leur survie et leur prolifération. Elles induisent notamment l'activation de signalisations impliquées dans la prolifération, et la surexpression de facteur de croissance et, à l'inverse, l'inhibition de l'expression de facteurs suppresseurs de tumeurs (Hanahan and Weinberg 2012).

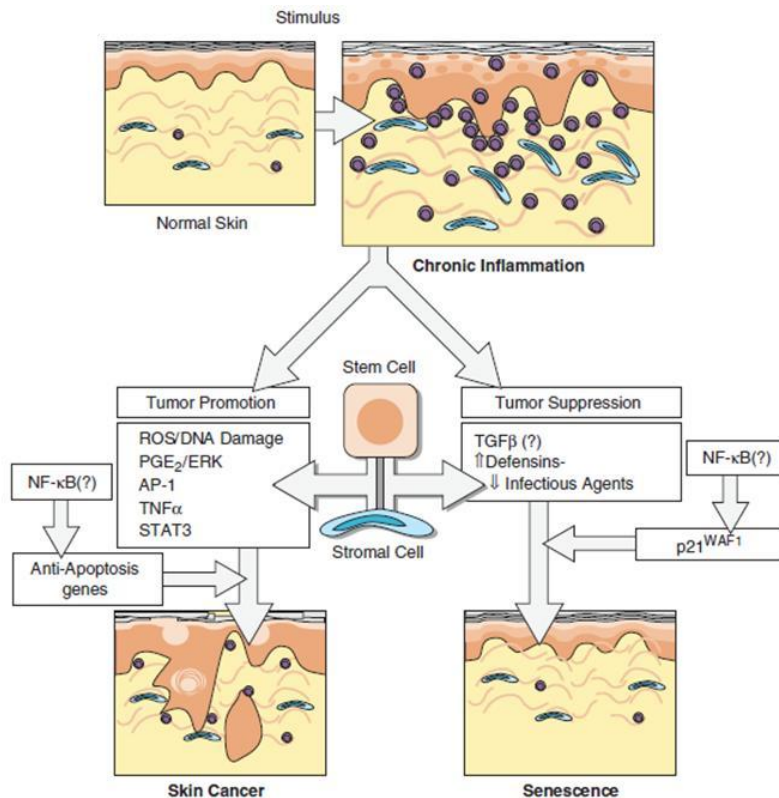
Concernant l'induction d'expression de facteurs de croissance et les signalisations qui en découlent, il a été observé que dans de nombreux cancers des mutations induisaient l'activation des voies de signalisation responsables de la prolifération cellulaire, comme la voie des MAPkinases (mitogen-activated protein kinases) (Hanahan and Weinberg 2012).

Un autre mécanisme consiste en l'inhibition de la transcription de gènes codant pour des facteurs suppresseurs de tumeurs. En effet, dans la plupart des cancers, l'activité de ces facteurs est diminuée ou est même absente. Parmi ces facteurs suppresseurs de tumeurs, citons par exemple p53 et Rb (rétinoblastome). En temps normal, ces deux facteurs interviennent dans la régulation du cycle cellulaire en induisant, si nécessaire, un arrêt de ce cycle voire l'apoptose lorsque la cellule présente des dommages au niveau de son ADN. Dans la majorité des cancers, l'expression de ces facteurs est inhibée ce qui a pour conséquence une dérégulation du cycle cellulaire, ce qui permet aux cellules dont l'ADN est endommagé d'échapper à la mort cellulaire (Hanahan and Weinberg 2012).

Ces mécanismes permettent donc d'induire une prolifération cellulaire menant à la formation d'une tumeur primaire. Cependant, la mortalité provoquée par les cancers n'est en général pas due à cette formation de tumeur primaire, mais au développement de métastases. La formation de métastases est également un des mécanismes élaborés par la cellule tumorale pour envahir les tissus. Des métastases se forment lorsqu'une cellule tumorale parvient à se détacher de la tumeur primaire, arrive à rejoindre la circulation lymphatique ou sanguine qu'elle quittera ensuite pour envahir un autre organe (*figure 2.1*) (Talmadge and Fidler 2010).

Au niveau de la peau notamment, l'inflammation pourrait également intervenir dans la tumorigenèse mais cette implication est controversée. En effet, lors d'une inflammation chronique, différents facteurs sécrétés sont capables d'induire l'activation de gènes anti-apoptotiques, pouvant mener à la prolifération cellulaire et la formation de tumeur. Cependant





(Nickoloff, Ben-Neriah *et al.* 2005)

**Figure 2.2 : Inflammation et cancer.** L'implication de l'inflammation dans le développement cancéreux est controversée. En effet lors d'une inflammation chronique, il y aura activation d'un certain nombre de gènes, certains pouvant être impliqués dans le développement tumoral par l'activation de gène anti-apoptotiques, tandis que d'autres gènes activés auront plutôt un effet inhibiteur de la prolifération entraînant une sénescence cellulaire.



(Rubin *et al* 2005)

**Figure 3.1 : Formes de carcinome basocellulaire.** Il existe différentes formes de carcinomes basocellulaires ; nodulaire (A et B), superficielle (C), pigmentée (D) ou mixte (E)

d'autres facteurs également sécrétés lors d'une inflammation chronique seraient plutôt impliqués dans la suppression tumorale et induiraient une sénescence cellulaire (*figure 2.2*) (Nickoloff, Ben-Neriah et al. 2005).

## 3 Les cancers de l'épiderme

### 3.1 Généralités

Les cancers de l'épiderme représentent la plus grande partie des cancers humains. La principale cause de développement de ces cancers est l'exposition aux rayons ultraviolets.

En effet, une exposition prolongée à ces rayons ultraviolets entraîne des dommages à l'ADN. Cependant si le gène p53, qui est un gène suppresseur de tumeur, fonctionne normalement, les dommages à l'ADN entraînent l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose de la cellule. Toutefois, si le gène p53 est muté, les cellules deviennent résistantes à l'apoptose et une prolifération anormale de ces cellules hébergeant des mutations devient possible, conduisant à la formation d'une population cellulaire anormale, pouvant mener à terme à la formation d'une tumeur primaire (Alam and Ratner 2001; Hussein 2005).

Outre l'exposition aux rayons ultraviolets, d'autres facteurs peuvent entraîner le développement tumoral au sein d'un épiderme, comme par exemple une exposition aux rayons ionisants, une exposition à des substances chimiques ou des infections.

Il existe trois types de cancers touchant l'épiderme : le carcinome basocellulaire, le carcinome spinocellulaire et le mélanome.

### 3.2 Le carcinome basocellulaire

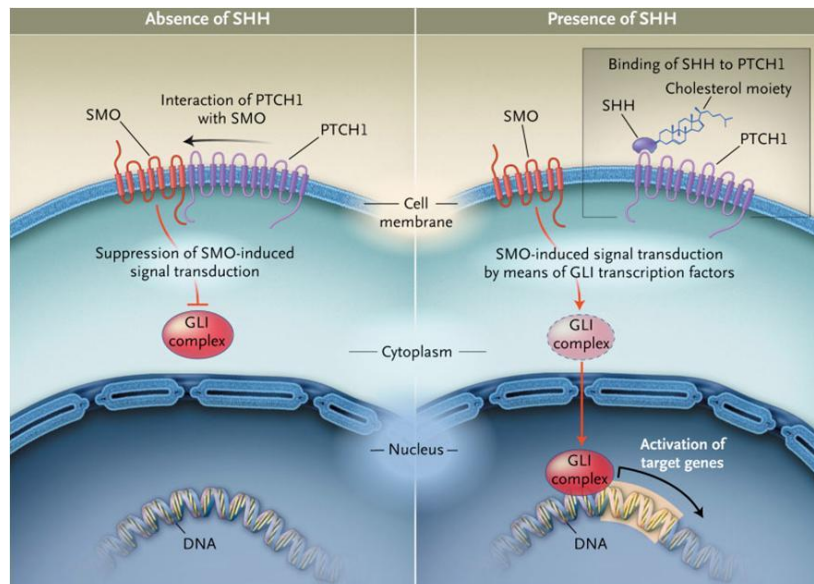
Le carcinome basocellulaire est celui qui touche le plus de personnes parmi les différents types de cancers épidermiques et l'incidence est en augmentation constante.

Outre les facteurs de risque décrits précédemment, certaines lésions de la peau comme des brûlures, des ulcères chroniques ou des dermatofibromes peuvent induire le développement d'un carcinome basocellulaire (Miller 1995; Rubin, Chen et al. 2005).

D'un point de vue **macroscopique**, le carcinome basocellulaire se caractérise par la présence de plaques ou de petits nodules présents à la surface de la peau touchant majoritairement la région de la tête et du cou mais également les régions du creux axillaire, des paumes des mains et des parties génitales (Fitzpatrick 2003; Rubin, Chen et al. 2005).

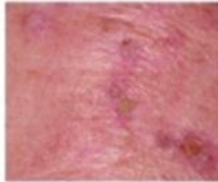


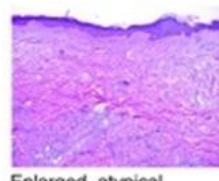
D'un point de vue **histologique**, le carcinome basocellulaire se développe à partir de cellules épithéliales ayant des caractéristiques de la couche basale. Ce type de carcinome est donc caractérisé par des cellules au noyau basophile occupant le centre de la cellule. Il existe différents types de carcinomes basocellulaires (*figure 3.1*) :

Le basocellulaire de type **nodulaire** se caractérise par la présence de larges nodules et de cellules basophiles.



(Rubin *et al* 2005)

**Figure 3.2 : Pathogénèse du carcinome basocellulaire.** En condition normale, PTCH1 (Protein patched homolog 1) interagit avec SMO (smoothened protein) pour inhiber l'expression de ses gènes cibles. Dans un carcinome basocellulaire, il y a une activation constitutive de la voie hedgehog (SHH), un signal extracellulaire qui se lie à PCTH1, empêchant l'inhibition de SMO, induisant ainsi l'activation de la transcription de gènes cibles responsables de la croissance et de la prolifération cellulaire.

	Normal skin	AK	cSCC	Metastatic cSCC
Clinical description				
		Scaly skin colored/pink macule or papule	Persistent firm or scaly papule or red nodule which may spontaneously bleed	Multiple nodular lesions in skin or internal organs
Histopathology				
Histological description	Well-defined stratum basalis, spinosum, and granulosum with orthokeratotic scale	Enlarged, atypical keratinocytes confined to the epidermis with parakeratotic scale	Enlarged, atypical keratinocytes invading the dermis	Enlarged, atypical keratinocytes in the dermis, lymph nodes, or internal organs, typically with no epidermal connection

(Ratushny *et al* 2012)

**Figure 3.3 : Histologie du carcinome spinocellulaire.** Le carcinome spinocellulaire se développe à partir d'une lésion précurseur qui est la kératose actinique (AK). Celle-ci est caractérisée par la présence de kératinocytes atypiques. Dans un carcinome spinocellulaire, ces kératinocytes envahissent le derme (cSCC). Lorsqu'ils envahissent d'autres organes, on parle de carcinome spinocellulaire métastatique (metastatic cSCC).

Le basocellulaire ***micronodulaire*** diffère du nodulaire par la présence de plusieurs petits nodules.

Le basocellulaire ***superficiel*** se caractérise par la présence de petits bourgeons cellulaires qui peuvent s'étendre dans le derme.

Enfin le basocellulaire ***mixte*** présente un stroma fibreux dense et riche en cellules.

D'un point de vue **moléculaire**, le carcinome basocellulaire se développe suite à une activation de la voie de signalisation *hegdehog* (HH). Il a également été démontré que dans la plupart des carcinomes basocellulaires une mutation dans le facteur PTCH1 (Protein patched homolog 1) induisait son inactivation. Cette perte de fonction empêche alors l'inhibition de SMO (smoothened protein) induisant l'activation de gènes de manière constitutive menant à la prolifération cellulaire (*figure 3.2*) (Rubin, Chen et al. 2005).

Une des caractéristiques particulières du carcinome basocellulaire est qu'il ne donne pas lieu à la formation de métastases. Le traitement, basé principalement sur l'exérèse de la tumeur par chirurgie, est donc en général plus facile et le pronostic vital est bon (Stevens 2004; Rubin, Chen et al. 2005).

### 3.3 Le carcinome spinocellulaire

C'est le deuxième cancer touchant le plus de personnes dans le monde. L'incidence en Europe est de 16 personnes pour 100.000 (Toll, Masferrer et al. 2013). Contrairement au basocellulaire, ce type de cancer est capable de métastaser et le pronostic vital est plus faible.

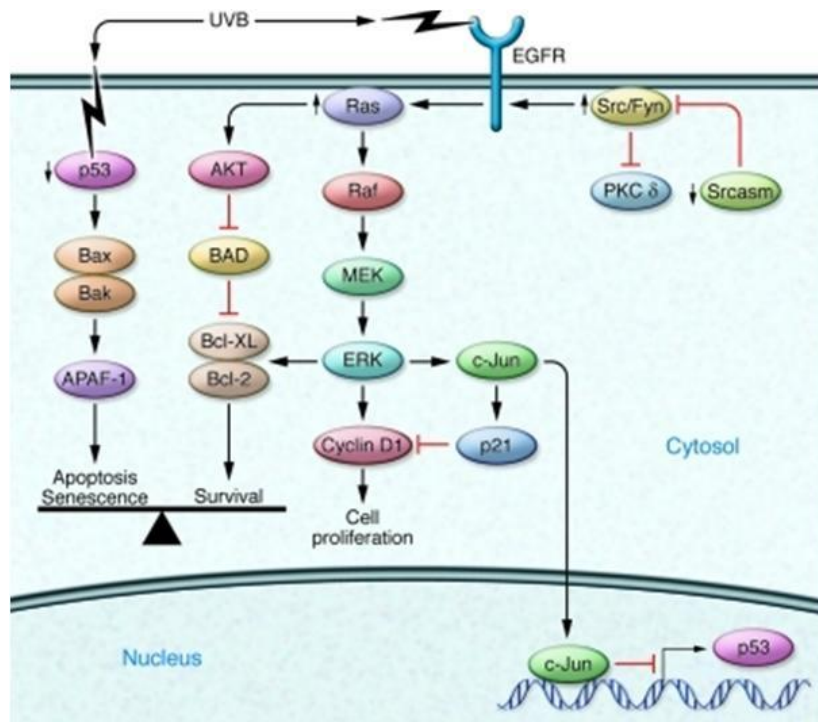
Le carcinome spinocellulaire touche d'autres zones que l'épiderme, notamment les muqueuses respiratoire et digestive (Alam and Ratner 2001).

Outre l'exposition aux rayons ultraviolets, d'autres facteurs de risque existent : l'exposition à des radiations ionisantes comme les rayons X, des infections telles que le papillomavirus et l'exposition à des substances chimiques comme l'arsenic ou le tabac (Markey 1995).

D'un point de vue **macroscopique**, le carcinome spinocellulaire épidermique forme un nodule dont la cicatrisation est impossible, ce qui mène à des saignements spontanés et à une absence de réparation tissulaire (Fitzpatrick 2003; Ratushny, Gober et al. 2012).

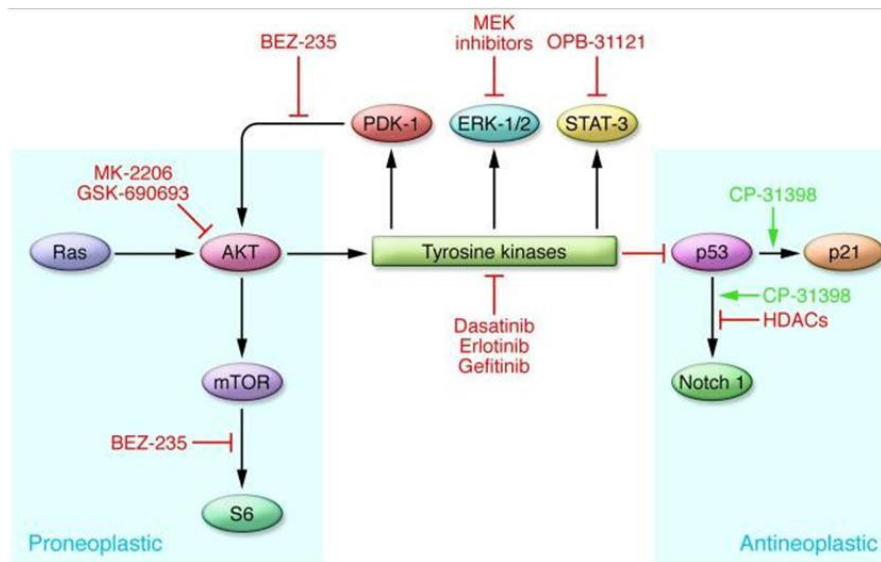
D'un point de vue **histologique**, un carcinome spinocellulaire présente une hyperplasie de l'épiderme lésionnel. Il se développe à partir d'une lésion précurseur : la kératose actinique, constituée de kératinocytes atypiques, qui peuvent ensuite envahir le derme et former ce que l'on appelle des perles cornées. Le carcinome spinocellulaire passe à un stade métastatique lorsque les kératinocytes atypiques envahissent le derme profond, les ganglions lymphatiques et atteignent d'autres organes (*figure 3.3*) (Fitzpatrick 2003; Ratushny, Gober et al. 2012).

Les mécanismes **moléculaires** impliqués dans le développement du carcinome spinocellulaire sont multiples et complexes, ils comprennent la perturbation de différentes voies de signalisation induisant l'activation de gènes entraînant la prolifération cellulaire. L'exposition aux rayons ultraviolets entraîne, d'une part, des dommages dans le gène p53 qui perturbe la régulation du cycle cellulaire et empêche l'apoptose des cellules. D'autre part, on observe une activation de la voie du récepteur de l'EGF (epidermal growth factor) et particulièrement de la famille RAS (Rat sarcoma). Ces protéines de la famille RAS activent deux voies de signalisation ; la première est celle des MAPkinases (Mitogen-activated protein kinases) qui active, d'une part, la cycline D1, intervenant dans la prolifération cellulaire et, d'autre part, active le facteur c-Jun, permettant de



(Ratushny *et al* 2012)

**Figure 3.4 : Pathogenèse du carcinome spinocellulaire.** L'exposition aux rayons ultraviolets induit la perte de fonction de p53 et l'induction de RAS, ce qui mène à la dérégulation du cycle cellulaire conduisant à une prolifération cellulaire non contrôlée.



(Ratushny *et al* 2012)

**Figure 3.5 : Pistes thérapeutiques basées sur l'inhibition ou l'activation des voies de signalisation dans le carcinome spinocellulaire.** Différentes pistes sont élaborées pour permettre le traitement du carcinome spinocellulaire. Une première piste serait d'activer p53 pour permettre l'arrêt du cycle cellulaire. Une seconde piste serait d'inhiber les gènes responsables de la prolifération cellulaire en agissant par exemple sur l'inhibition de AKT ou sur la voie des MAPkinases et l'activité des tyrosines kinases.



bloquer la transcription de p53. La deuxième voie activée est celle de AKT (aussi appelée protéine kinase B) qui inhibe les facteurs responsables de l'apoptose. C'est principalement via ces deux voies que se développent les carcinomes spinocellulaires. Cependant, certains carcinomes présentent une augmentation de l'activité de Fyn qui est une tyrosine kinase régulant le niveau de p53. En condition normale, Fyn est inhibée par Srcasm qui est un régulateur négatif des tyrosines kinases. Cependant il a été observé que Srcasm a une activité diminuée dans les carcinomes spinocellulaires et n'arrive plus à inhiber Fyn. Fyn peut alors, via la voie du récepteur de l'EGF (EGFR) induire l'activation de c-Jun qui inhibe la transcription de p53 (*figure 3.4*) (Ratushny et al 2012). La voie de STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) semble également être impliquée dans la pathogenèse. STAT3 est un facteur de transcription régulant une série de gènes impliqués dans l'apoptose et le cycle cellulaire, et il a été montré que des souris transgéniques exprimant de manière constitutive ce facteur développaient des carcinomes spinocellulaires suite à une exposition aux rayons ultraviolets (Kim, Angel et al. 2009).

Le **traitement** du carcinome spinocellulaire est basé sur des traitements chirurgicaux et médicamenteux. Pour traiter la kératose actinique qui est le précurseur du carcinome spinocellulaire, le principal agent utilisé est le 5-FU qui inhibe la synthèse d'ADN. Cependant, ce type de traitement provoque beaucoup d'effets secondaires. Il est donc nécessaire d'élaborer de nouvelles pistes thérapeutiques. À l'heure actuelle, les études de développement de médicaments se basent sur l'inhibition des voies de signalisation impliquées dans l'évolution du carcinome (*figure 3.5*). Il existe deux possibilités de thérapie : interférer avec les voies responsables de la prolifération et activer les voies des suppresseurs de tumeurs tels que p53 qui permettent l'arrêt du cycle cellulaire. Parmi les molécules agissant comme des inhibiteurs, citons le MK-2206 et le GSK-690693 qui inhibent l'activité de AKT ainsi que OPB-31121 qui cible STAT3. Des molécules inhibant les tyrosines kinases et la voie de signalisation des MAPkinases sont également en cours d'étude (Ratushny, Gober et al. 2012).

### 3.4 Le mélanome

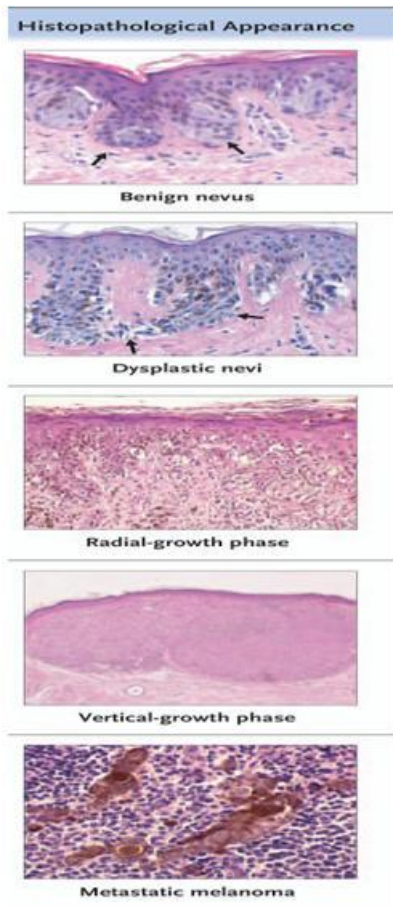
Comme décrit précédemment, les mélanocytes, présents dans la couche basale de l'épiderme, sont les cellules responsables de la production de mélanine permettant la pigmentation de la peau et la protection contre les rayons ultraviolets.

Ces mélanocytes peuvent former des tumeurs bénignes appelées naevus ou, plus familièrement, grains de beauté.

Cependant, il arrive dans certaines situations que des perturbations moléculaires et cellulaires provoquent une prolifération de ces cellules pouvant mener au développement d'une tumeur maligne appelée mélanome.

Chaque année, plus de 100.000 cas de mélanomes sont diagnostiqués dans le monde et ce taux est en augmentation constante. Le principal facteur de risque est l'exposition aux rayons ultraviolets. De plus, il a été démontré que certains phénotypes amplifiaient le risque de développer un mélanome, notamment les peaux très claires plus sensibles aux rayons ultraviolets. Il existe aussi des formes de mélanomes dit familiaux.

D'un point de vue **macroscopique**, le mélanome se caractérise par une modification morphologique ou de couleur d'un naevus bénin ou par l'apparition d'une tache pigmentée (Miller and Mihm 2006).



**Figure 3.6: Modèle Clark dans le développement d'un mélanome.** Le modèle Clark comprend 5 étapes durant lesquelles les mélanocytes acquièrent des capacités de prolifération et présentent des modifications morphologiques.

(Miller and Mihm 2006)

D'un point de vue **histologique**, la progression du mélanome se fait par différentes étapes reprises dans le modèle Clark. Celui-ci comprend 5 étapes (*figure 3.6*) : la première lésion, appelée naevus bénin (Benign nevus), correspond à une étape pendant laquelle la prolifération des mélanocytes provoque des lésions bénignes ; lors de la seconde étape, les mélanocytes anormalement prolifératifs deviennent dysplasiques ; la troisième étape (radial-growth phase), est une phase durant laquelle les mélanocytes envahissent les couches de l'épiderme et prolifèrent dans ces différentes couches ; la quatrième étape est également une phase d'invasion mais qui, cette fois-ci, s'étend jusqu'au derme (vertical-growth phase), enfin la dernière phase correspond à l'invasion d'autres tissus et la formation de métastases (metastatic melanoma) (**Fitzpatrick** 2003; Miller and Mihm 2006).

Les mécanismes **moléculaires** impliqués dans le développement du mélanome sont multiples et touchent différents gènes responsables, entre autre, de la régulation du cycle cellulaire. Un des mécanismes principaux est l'activation de la voie de signalisation des MAP kinases engendrée par des mutations au niveau du gène BRAF, ce qui induit une prolifération des mélanocytes (Miller and Mihm 2006).

Le **traitement** choisi est dépendant du type de mélanome. La méthode principale consiste d'abord en l'excision de la tumeur. La chirurgie devra être couplée à de la radiothérapie, à de l'immunothérapie, et de la chimiothérapie si le cancer est devenu métastatique. Le pronostic est en général assez bon pour les tumeurs locales, mais devient extrêmement négatif lorsqu'il y a présence de métastases (Miller and Mihm 2006).

Il existe donc différents types de cancers pouvant toucher l'épiderme ; cependant, lors de ce mémoire, nous nous sommes focalisés sur le carcinome spinocellulaire, dans lequel la podoplanine (voir le point 4) est fréquemment surexprimée (Schacht, Dadras et al. 2005; Martin-Villar, Megias et al. 2006).

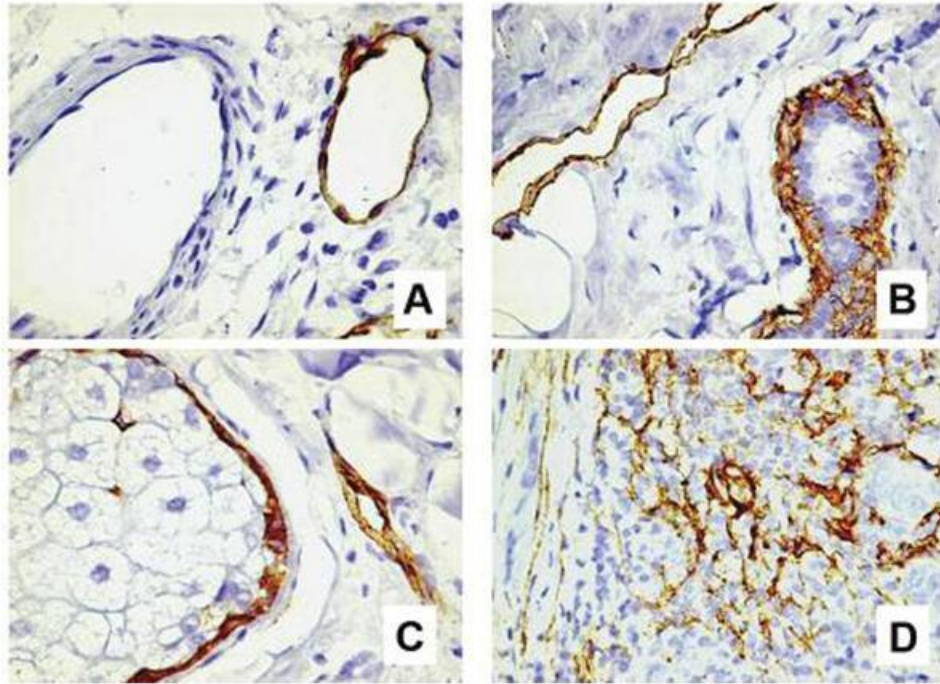
### 3.5 Les modèles d'étude du carcinome spinocellulaire

Pour mieux comprendre les mécanismes de développement du carcinome spinocellulaire, des modèles d'étude sont utilisés. Il existe des modèles *in vitro* et des modèles *in vivo*.

Les principaux modèles *in vitro* utilisés sont des cultures en monocouche de lignées cancéreuses issues de carcinomes spinocellulaires. Ces modèles permettent d'étudier facilement des facteurs pouvant intervenir dans le développement cancéreux. L'introduction de vecteurs d'expression est également aisée dans ce type de modèle et la visualisation du phénotype des cellules vivantes peut se faire directement par observation au microscope. Cependant, le principal inconvénient de ce modèle réside dans son éloignement par rapport à la situation retrouvée *in vivo* (Ratushny, Gober et al. 2012).

Des modèles *in vitro* en trois dimensions commencent également à être développés. Ceux-ci consistent en la reconstruction d'épidermes ou de « peaux équivalentes » permettant d'obtenir des modèles tissulaires plus proches de la situation *in vivo*. Ces modèles sont obtenus à partir de cellules issues de carcinomes spinocellulaires qui sont cultivées soit dans un épiderme reconstruit constitué de kératinocytes normaux, soit cultivés seules pour former un tissu reconstruit constitué uniquement de ces cellules cancéreuses. Des modèles de peaux équivalentes sont également développés dans lesquels les cellules cancéreuses sont cultivées sur un équivalent de derme (Commandeur, de Gruijl et al. 2009; Commandeur, van Drongelen et al. 2012; Brauchle, Johannsen et al. 2013).





(Raica *et al* 2008)

**Figure 4.1 : Expression de la podoplanine dans différents tissus.** La podoplanine est exprimée dans de nombreux tissus, notamment au niveau des vaisseaux lymphatiques (A), au niveau des cellules myoépithéliales (B), au niveau des glandes sébacées (C), et également au niveau des cellules dendritiques folliculaires (D).

Les modèles *in vivo* quant à eux, font intervenir l'utilisation des animaux. Un premier modèle consiste en l'injection de cellules cancéreuses dans la peau de souris dans le but d'étudier le développement des tumeurs dans un organisme vivant. Un second modèle consiste en la création de souris transgéniques ou knockout pour étudier l'influence d'un gène particulier, ce qui permettra d'étudier son implication dans le cancer (Ratushny, Gober et al. 2012). À l'heure actuelle, plusieurs modèles ont pu être établis. Des souris transgéniques surexprimant des facteurs impliqués dans la voie de l'EGFR comme ErbB2, également appelé HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), Src (sarcoma), et la kinase MEK-1 (Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1) sous le contrôle de promoteurs des kératines, développent des lésions néoplasiques au niveau de l'épiderme similaires aux carcinomes spinocellulaires (Matsumoto, Jiang et al. 2002; Matsumoto, Jiang et al. 2003; Ratushny, Gober et al. 2012). Une souris transgénique exprimant Fyn sous le contrôle du promoteur de la kératine 14 développe, quant à elle, des lésions ressemblant à la kératose actinique, précurseur du carcinome spinocellulaire (Zhao, Li et al. 2009). Des souris transgéniques pour RAS développent aussi des hyperplasies de l'épiderme (Tarutani, Cai et al. 2003; Lapouge, Youssef et al. 2011). Enfin, la surexpression de STAT3 chez les souris entraîne le développement tumoral suite à l'exposition aux rayons ultraviolets (Kim, Angel et al. 2009).

Il existe donc de nombreux modèles d'étude *in vivo*. Cependant, pour des raisons éthiques, il est nécessaire de réduire au maximum l'utilisation des animaux de laboratoire. Il est donc intéressant d'élaborer de nouveaux modèles d'études *in vitro* du carcinome spinocellulaire.

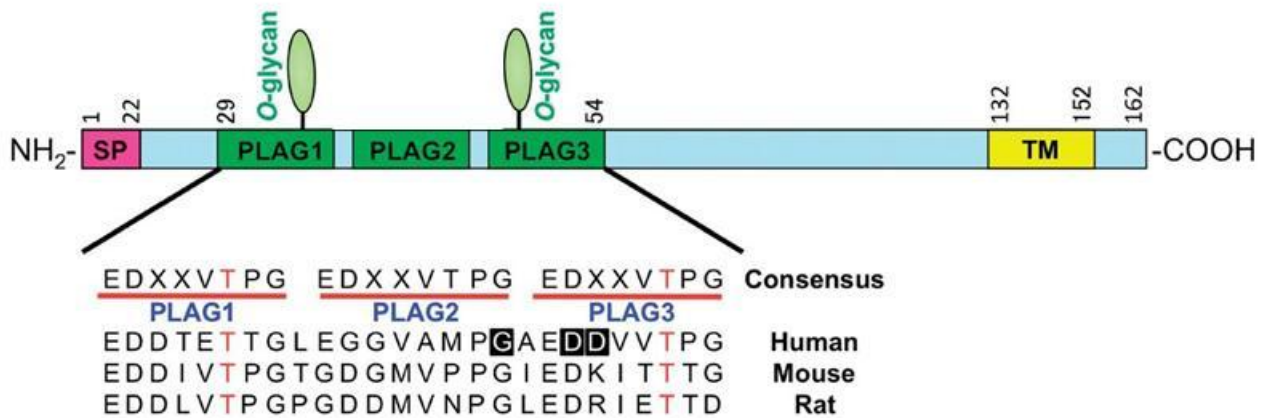
Dans ce mémoire, l'élaboration d'un modèle en trois dimensions d'épiderme reconstruit sera réalisée en utilisant des cellules issues d'un carcinome spinocellulaire, qui pourront être visualisées de manière directe et aisée, dans le but d'étudier leur comportement au sein d'un tissu stratifié.

## **4 La podoplanine**

### **4.1 Introduction**

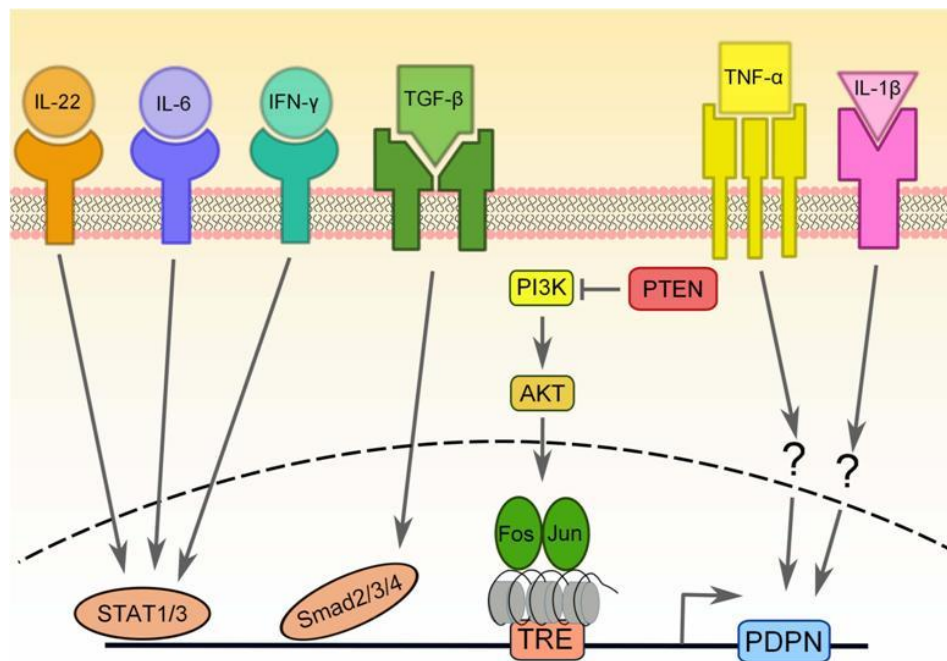
La podoplanine est une protéine transmembranaire de type mucine constituée de 162 acides aminés. L'expression de la podoplanine a été découverte pour la première fois en 1996 au niveau des cellules endothéliales lymphatiques par l'équipe de Wetterwald (Wetterwald, Hoffstetter et al. 1996). Son expression a ensuite été observée par l'équipe de Breiteneder-Geleff en 1997 au niveau des podocytes du glomérule rénal, d'où son nom. Le rôle de cette protéine au niveau des podocytes n'est pas très clair, mais il semblerait qu'elle soit impliquée dans la régulation de la perméabilité glomérulaire via une action sur la forme des podocytes (Breiteneder-Geleff, Matsui et al. 1997; Raica, Cimpean et al. 2008; Astarita, Acton et al. 2012).

Par la suite, il a été découvert que la podoplanine est exprimée par les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques, mais pas dans celles des vaisseaux sanguins. À l'heure actuelle, cette protéine est souvent utilisée en immunohistochimie comme marqueur des vaisseaux lymphatiques (*figure 4.1*) (Raica, Cimpean et al. 2008; Astarita, Acton et al. 2012). La podoplanine est également exprimée dans d'autres tissus et organes, comme le muscle squelettique, les organes lymphoïdes, le placenta, le cerveau, les poumons, le cœur et notamment la peau au niveau des follicules pileux et des glandes sébacées (Raica, Cimpean et al. 2008).



(Fujita and Takagi 2012)

**Figure 4.2 : Représentation de la structure de la podoplanine.** La podoplanine est une protéine transmembranaire constituée de 162 acides aminés et composée d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'une queue cytoplasmique.



Astarita et al 2012

**Figure 4.3 : Facteurs impliqués dans la régulation transcriptionnelle de la podoplanine lors d'un processus inflammatoire.** La transcription de la podoplanine serait activée par des cytokines inflammatoires comme l'interleukine 22 (IL-22) et l'interleukine 6 (IL-6), mais pourrait également être activée par l'interféron gamma (IFN-γ), le transforming growth factor beta (TGF-β) ainsi que par le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-α) et l'interleukine 1-beta (IL-1β).

## 4.2 Fonctions

Les fonctions de la podoplanine ne sont pas encore clairement identifiées, cependant il semblerait que cette protéine ait un rôle dans le développement embryonnaire. En effet, il a été montré que la podoplanine est exprimée au niveau du myocarde, et du système nerveux central d'embryons murins au début de leur développement, et que cette expression s'étend à d'autres organes comme les intestins, l'œsophage et les reins au fur et à mesure du développement embryonnaire. D'autre part, l'invalidation du gène chez les souris induit la mort à la naissance à cause de problèmes respiratoires. Ces souris knockout présentent également des défauts dans le développement des vaisseaux lymphatiques causant des perturbations du transport de la lymphe et la formation d'œdèmes. En outre, des défauts de développement du myocarde ont également été observés, corrélés à des perturbations morphologiques cardiaques (Schacht, Ramirez et al. 2003; Mahtab, Wijffels et al. 2008; Mahtab, Vicente-Steijn et al. 2009; Astarita, Acton et al. 2012).

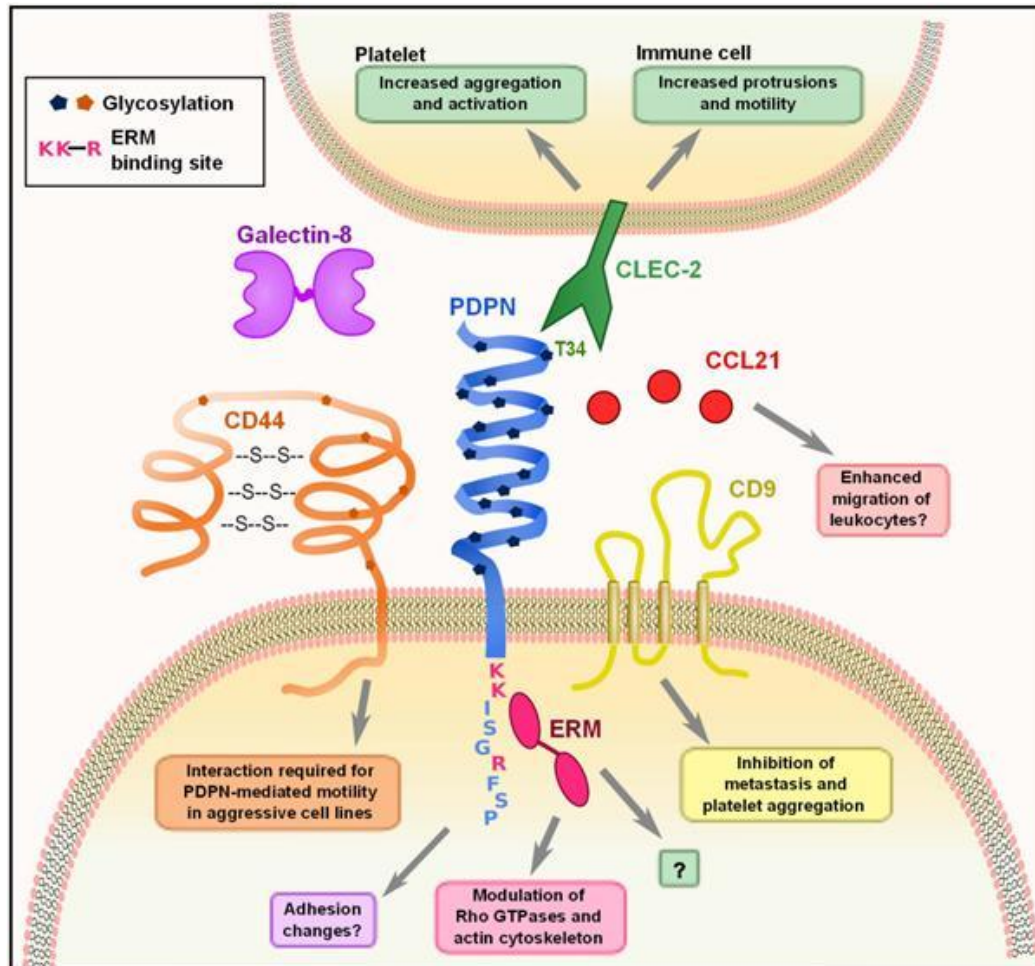
Lors du développement, la podoplanine semble également intervenir dans la transition épithélio-mésenchymateuse. Cette transition consiste en une modification du phénotype cellulaire dans laquelle des cellules de type épithéliales maintenues entre elles par des jonctions modifient leur phénotype en réduisant l'expression de marqueurs de type épithéliaux pour se transformer en cellules de type mésenchymateuses beaucoup plus mobiles, notamment grâce à l'augmentation de l'expression de marqueurs de type mésenchymaux comme la N-cadhérine et la vimentine. Lors du développement embryonnaire, cette transition épithélio-mésenchymateuse est indispensable pour permettre la migration cellulaire et le développement correct des futurs tissus. Il a été démontré que les souris knockout pour la podoplanine présentaient des défauts dans cette transition épithélio-mésenchymateuse (Astarita, Acton et al. 2012).

## 4.3 Structure et régulation

La podoplanine est une protéine transmembranaire faisant partie de la famille des glycoprotéines de type sialomucine de type I. Elle est composée de différentes parties : d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique (*figure 4.2*). Le domaine extracellulaire est constitué de 112 acides aminés et est riche en résidus sérine et thréonine, sites de O-glycosylation. Ce domaine contient également trois séquences identiques répétées EDXXVTPG nommées domaines PLAG pour Platelet Aggregation Stimulating Domains. Ces séquences répétées sont conservées chez les primates, les carnivores et les rongeurs (Kaneko, Kato et al. 2006). Le domaine transmembranaire est composé d'une vingtaine d'acides aminés. Pour terminer, la queue cytoplasmique est composée d'une dizaine d'acides aminés seulement, dont deux sérines qui auraient un rôle dans la régulation de la mobilité cellulaire (Raica, Cimpean et al. 2008; Fujita and Takagi 2012; Krishnan, Ochoa-Alvarez et al. 2013).

Le gène de la podoplanine s'étend sur 34.2 kb et est composé de 8 exons. Il semblerait également qu'un épissage alternatif produise deux types d'ARN messagers à partir du gène (Raica, Cimpean et al. 2008).

En ce qui concerne la régulation, un facteur appelée Prox-1 issu d'un gène de type homeobox régule l'expression de la podoplanine lors du développement des vaisseaux lymphatiques (Raica, Cimpean et al. 2008). L'expression de la podoplanine serait également activée par des cytokines impliquant l'activation de différentes voies de signalisation (*figure 4.3*). Une première voie est celle de STAT 1/3 qui serait activée par les interleukines 6 et 22 (IL-6 et IL-22) et par l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). La protéine TGF- $\beta$  (transforming growth factor), quant à elle, activerait



(Astarita *et al* 2012)

**Figure 4.4 : Interactions de la podoplanine avec d'autres facteurs.** La podoplanine élabore de nombreuses interactions; elle interagit notamment avec le récepteur CLEC-2 présent sur les plaquettes sanguines, induisant l'agrégation plaquettaire. Elle interagit avec les protéines ERM (ezrine, radixine et moesine), permettant la modulation du cytosquelette. La podoplanine interagit également avec CD44, facteur intervenant dans la migration cellulaire.

Smad 2/3 et 4 permettant la transcription de gènes cibles, dont la podoplanine. La voie de signalisation de la PI3kinase pourrait également être impliquée dans l'activation de la transcription de la podoplanine : la PI3kinase (PI3K) active AKT qui, à son tour, active AP-1, facteur de transcription formé par la dimérisation de c-Fos et c-Jun. AP-1 se lie ensuite au promoteur TRE (tetradecanoylphorbol acetate-responsive element) de la podoplanine de manière à induire sa transcription. Le facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$  tumor necrosis factor- $\alpha$ ) et l'interleukine 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) pourraient également induire l'activation de transcription de la podoplanine mais les voies impliquées à ce niveau ne sont pas connues (Astarita, Acton et al. 2012).

## 4.4 Interactions et mécanismes d'action

La podoplanine interagirait avec de nombreux facteurs, à la fois de façon extracellulaire et intracellulaire. Dès lors, les mécanismes d'action de cette protéine pourraient dépendre de ces interactions (*figure 4.4*).

Une première interaction extracellulaire est celle réalisée entre la podoplanine et les plaquettes sanguines. Cette interaction est permise grâce aux domaines PLAG décrits précédemment. En effet, ces domaines sont reconnus par un récepteur de type lectine présent à la surface des plaquettes appelé CLEC-2 pour C-type lectin-like receptor 2. L'interaction entre la podoplanine et CLEC-2 entraîne l'agrégation plaquettaire. Cette agrégation plaquettaire permettrait aux cellules tumorales présentes dans le vaisseau sanguin de se déplacer plus facilement ; celles-ci, entourées par les plaquettes agrégées, seraient également protégées de « l'attaque » du système immunitaire (Fujita and Takagi 2012).

La podoplanine serait également capable d'interagir avec CD44, principal récepteur de l'acide hyaluronique. Une analyse par coimmunoprécipitation a montré que la podoplanine interagissait bien avec ce récepteur. Cette interaction favoriserait notamment la migration cellulaire (Martin-Villar, Fernandez-Munoz et al. 2010).

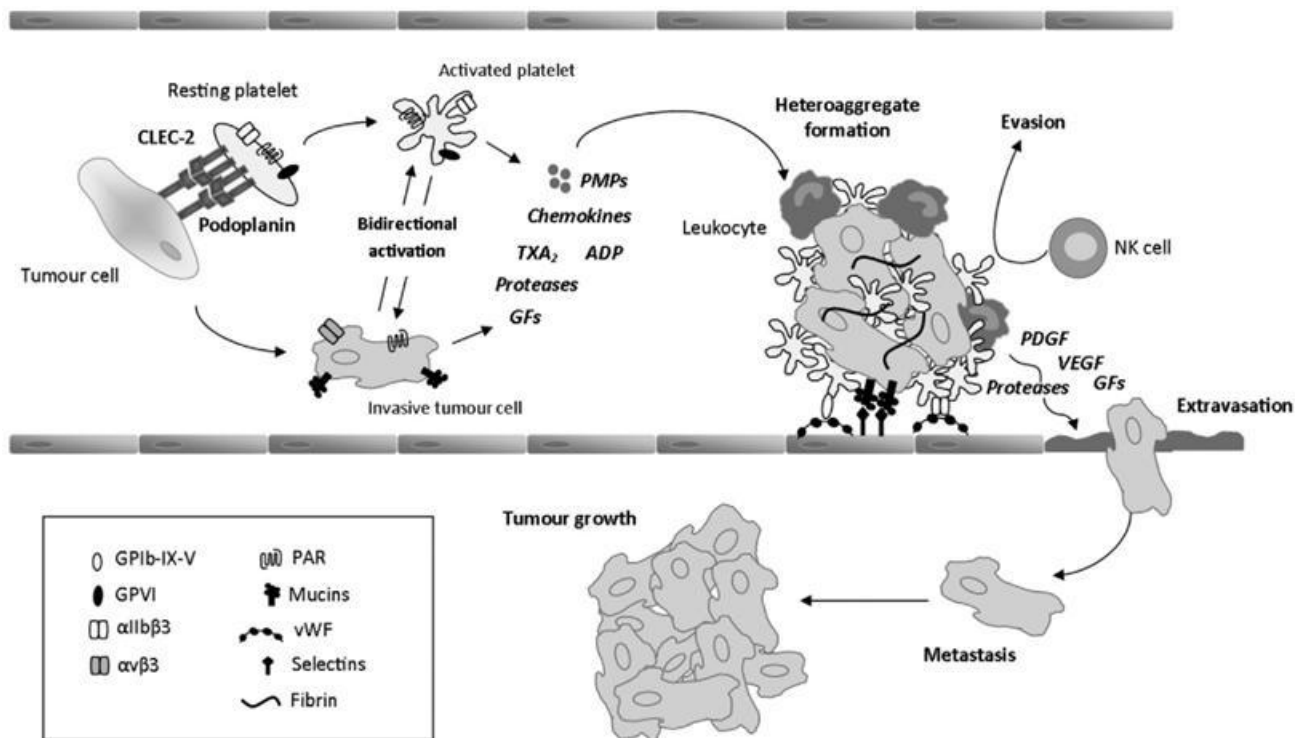
D'un point de vue intracellulaire, la podoplanine semble interagir avec des protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine, ce qui permettrait à la cellule de modifier sa forme et faciliterait sa migration. (Astarita, Acton et al. 2012). La podoplanine interagirait notamment avec la famille des protéines ERM (ezrine, radixine, moesine) qui sont des protéines intervenant dans la régulation du cytosquelette. Cette interaction induit l'activité de RhoA (Ras homolog gene family member A) qui est une GTPase permettant l'organisation du cytosquelette (Raica, Cimpan et al. 2008).

## 4.5 Podoplanine et cancer

Bien que les fonctions précises de la podoplanine ne soient pas encore connues, il semblerait que cette protéine joue un rôle important dans le développement tumoral et, notamment, dans l'invasion cancéreuse. En effet, de nombreuses études ont montré que cette protéine était exprimée dans de nombreux cancers, principalement au niveau du front invasif des tumeurs. (Wicki and Christofori 2007; Krishnan, Ochoa-Alvarez et al. 2013). Différents mécanismes ont été proposés concernant le rôle de la podoplanine dans le processus cancéreux.

Un premier mécanisme mettrait en jeu l'action de la podoplanine sur les plaquettes sanguines. En effet, comme décrit précédemment, l'interaction avec CLEC-2 présent sur les plaquettes induit leur agrégation. Les cellules tumorales exprimant la podoplanine activent les plaquettes qui, à leur tour, produisent des chemokines pour renforcer leur agrégation. Les plaquettes agrégées entourent alors les cellules tumorales qui seront ainsi protégées de l'attaque du système





(article Lowe *et al* 2012)

**Figure 4.5 : Interaction entre la podoplanine et les plaquettes, implication dans le cancer.** La podoplanine interagit grâce à ses domaines PLAG avec le récepteur CLEC-2 présent sur les plaquettes. Cette interaction induit l'activation des plaquettes qui vont à leur tour sécréter des facteurs comme des chemokines, ce qui permettra l'agrégation plaquettaire. Les cellules tumorales seront ensuite entourées par ces plaquettes agrégées permettant la protection contre l'attaque du système immunitaire. Les cellules tumorales suivront alors le flux sanguin jusqu'à l'arrêt au niveau de la paroi de l'endothélium d'un organe à distance de la tumeur primaire. Cette paroi sera finalement dégradée par la sécrétion de protéases dont les MMPs par les plaquettes, permettant l'entrée des cellules tumorales dans l'organe et la formation de métastases.

immunitaire et qui pourront suivre le flux sanguin jusqu'à atteindre un autre organe. L'interaction entre les plaquettes et la paroi de l'endothélium permettra la libération de protéases telles que les métalloprotéinases matricielles (MMPs) par les plaquettes qui dégraderont la lame basale de l'endothélium pour permettre l'entrée des cellules tumorales dans le nouveau tissu, menant à la formation de métastases (*figure 4.5*) (Fujita and Takagi 2012; Lowe, Navarro-Nunez et al. 2012).

Un second mécanisme serait l'implication de la podoplanine dans la transition épithélio-mésenchymateuse.

Comme décrit précédemment, la transition épithélio-mésenchymateuse est un mécanisme élaboré par les cellules pour favoriser leur mobilité par modification d'expression de certains facteurs, processus qui est utilisé en condition normale par les cellules lors du développement embryonnaire. Cependant, certaines cellules tumorales peuvent également induire cette transition épithélio-mésenchymateuse par le même processus de réduction d'expression des marqueurs épithéliaux au profit des marqueurs mésenchymaux avec pour conséquence l'invasion et la formation de métastases.

L'équipe de Martin-Villar en 2006 a démontré que la podoplanine interviendrait dans la transition épithélio-mésenchymateuse. En effet, la surexpression de la podoplanine dans des cellules épithéliales rénales (cellules MDCK) s'accompagne d'une diminution de l'expression des marqueurs épithéliaux tels l'E-cadhérine, et d'une augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymaux tels la N-cadhérine (Martin-Villar, Megias et al. 2006).

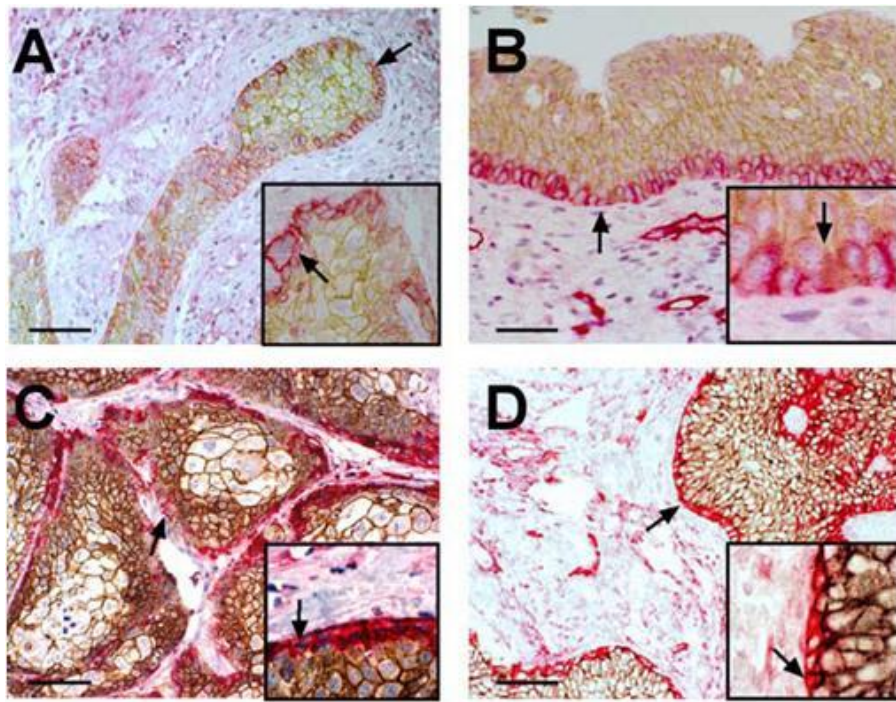
Cependant, une autre équipe a obtenu des résultats opposés dans un modèle de culture de cellules obtenues à partir d'un cancer du sein (MCF7), transfectées par un vecteur d'expression de la podoplanine. Les résultats ont montré que l'expression de l'E-cadhérine n'est pas modifiée dans les cellules MCF7 transfectées qui surexpriment la podoplanine (Wicki, Lehembre et al. 2006).

Il a également été montré, dans un modèle de souris transgénique développant des cancers du pancréas, une expression de la podoplanine dans les cellules tumorales invasives alors qu'il n'y avait pas de modification d'expression des marqueurs épithéliaux et donc pas d'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (Wicki, Lehembre et al. 2006). L'implication de la podoplanine dans ce processus est donc controversée.

Il apparaîtrait également que la podoplanine, par son interaction avec la protéine ezrine, induirait une modification du cytosquelette, menant au changement phénotypique cellulaire et à une induction de la migration pouvant conduire à l'invasion des cellules tumorales (Wicki and Christofori 2007). En effet, dans des cellules cancéreuses surexprimant la podoplanine, une colocalisation de cette protéine avec la protéine ezrine est observée au niveau des extensions membranaires (Martin-Villar, Megias et al. 2006; Wicki, Lehembre et al. 2006; Wicki and Christofori 2007).

Du point de vue des kératinocytes, l'interaction entre la podoplanine, CD44 et les protéines ERM entraînerait la modification morphologique des cellules, avec l'émission d'extensions membranaires qui augmenteraient leur mobilité et leur migration, pouvant conduire ainsi à la formation de métastases (Martin-Villar, Fernandez-Munoz et al. 2010). Il a également été montré, dans des kératinocytes murins, la présence d'une induction de transition épithélio-mésenchymateuse (Scholl, Gamallo et al. 2000).





(Wicki *et al* 2006)

**Figure 4.6 : Surexpression de la podoplanine dans de nombreux carcinomes dont le carcinome spinocellulaire.** Des immunomarquages de la podoplanine (en rouge), montrent qu'elle est exprimée dans différents types de carcinomes; au niveau d'un carcinome de l'œsophage (A), du carcinome spinocellulaire de l'épiderme (B), ainsi qu'au niveau de carcinome respiratoire (C) et génital (D). Barre d'échelle = 50  $\mu$ m

En conclusion, la podoplanine participerait au développement tumoral via plusieurs mécanismes. L'intérêt pour l'étude de cette protéine est donc grand et il est nécessaire d'étudier et de comprendre ses mécanismes d'action et son rôle précis dans le développement tumoral.

Etant donné qu'une surexpression de la podoplanine est retrouvée dans le carcinome spinocellulaire épidermique (*figure 4.6*), ce type de cancer fera l'objet de ce travail. (Schacht, Dadras et al. 2005; Martin-Villar, Megias et al. 2006; Wicki, Lehembre et al. 2006).

C'est en 2005 que l'équipe de Martin-Villar a observé cette surexpression en comparant l'expression de la podoplanine, par immunomarquages, entre un épithélium normal et un carcinome spinocellulaire. Les résultats ont clairement montré une immunoréactivité importante dans le carcinome alors que le signal est absent dans l'épiderme normal. (Martin-Villar, Scholl et al. 2005). Des tumeurs obtenues à partir d'exérèses réalisées sur des patients atteints de carcinome ont montré qu'il y avait une expression de la protéine dans 66 % des spécimens (Shimada, Ishii et al. 2009).

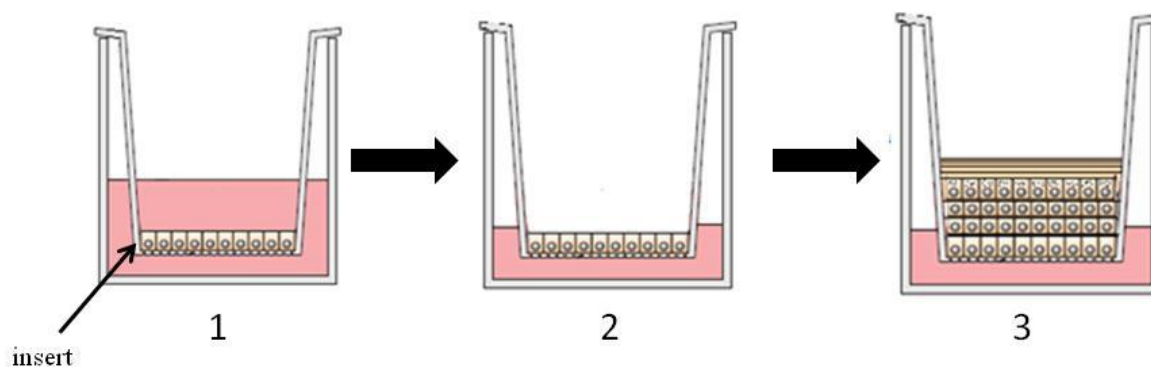
L'expression de la podoplanine a ensuite été analysée dans des cellules de tumeurs orales de carcinome spinocellulaire par immunohistochimie et a montré la présence de cette protéine dans les tumeurs avec une localisation hétérogène, surtout au niveau de la membrane plasmique (Martin-Villar, Scholl et al. 2005).

Enfin, une dernière équipe a montré que, dans des carcinomes spinocellulaires moyennement différenciés, la podoplanine était exprimée au niveau de la couche basale tumorale tandis que dans des carcinomes spinocellulaires non différenciés, l'expression de la podoplanine s'étend aux couches supérieures. À l'inverse, lorsque les tumeurs sont bien différenciées, la podoplanine n'est pas exprimée (Schacht, Dadras et al. 2005).

Comme décrit auparavant, un des mécanismes dans lequel la podoplanine serait impliquée pour permettre le développement tumoral est l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse. Des études ont montré que cette induction était également retrouvée dans le carcinome spinocellulaire. En effet, une équipe a analysé l'expression des marqueurs épithéliaux dans des carcinomes spinocellulaires. Les résultats ont montré une perte d'expression de l'E-cadhérine dans 77% des tumeurs. En analysant ensuite l'expression des marqueurs mésenchymaux, il a été observé une augmentation de l'expression de la vimentine dans 67.9 % des tumeurs. De plus, dans la plupart des tumeurs exprimant la vimentine, la podoplanine est également exprimée, montrant la possible importance de cette protéine dans la transition épithélio-mésenchymateuse (Toll, Masferrer et al. 2013).

Un autre mécanisme impliqué dans le développement du carcinome spinocellulaire est la modification de l'adhésion cellulaire par l'interaction entre la podoplanine et CD44. En effet, cette interaction intervient dans la modulation de l'adhésion et de la migration cellulaire permettant le maintien des cellules cancéreuses entre elles pour former des niches tumorales (Tsuneki, Yamazaki et al. 2013).

Ces nombreuses études démontrent donc que la podoplanine pourrait tenir une place importante dans le développement du carcinome spinocellulaire.



**Figure 5.1 : Reconstruction d'épidermes humains *in vitro*.** (1) Les kératinocytes sont ensemencés sur des filtres de polycarbonate (inserts) présentant des pores pour permettre les apports nutritifs du milieu présent sous l'insert. (2) L'interface air-liquide réalisée 24 heures après l'ensemencement permet la formation de la barrière épidermique. (3) Après 11 jours de culture, l'épiderme obtenu reproduit l'architecture de l'épiderme *in vivo*.

## 5 La culture de kératinocytes

Lors de ce travail, la mise au point d'un modèle *in vitro* de carcinome spinocellulaire au sein d'un environnement épidermique nécessite la réalisation de cocultures de kératinocytes normaux et cancéreux.

Du point de vue des kératinocytes cancéreux, le choix s'est porté sur la lignée A431, d'une part parce que cette lignée provient d'un carcinome spinocellulaire épidermique et, d'autre part, parce que ces cellules possèdent un grand potentiel prolifératif. En outre, notons que ces cellules possèdent la particularité de surexprimer le récepteur de l'EGF.

Du point de vue des kératinocytes normaux, les cellules proviennent d'abdominoplasties. Au laboratoire, deux modèles de culture des kératinocytes normaux sont utilisés : le modèle de **monocouche** et le modèle d'**épiderme reconstruit**.

### 5.1 La culture en monocouche

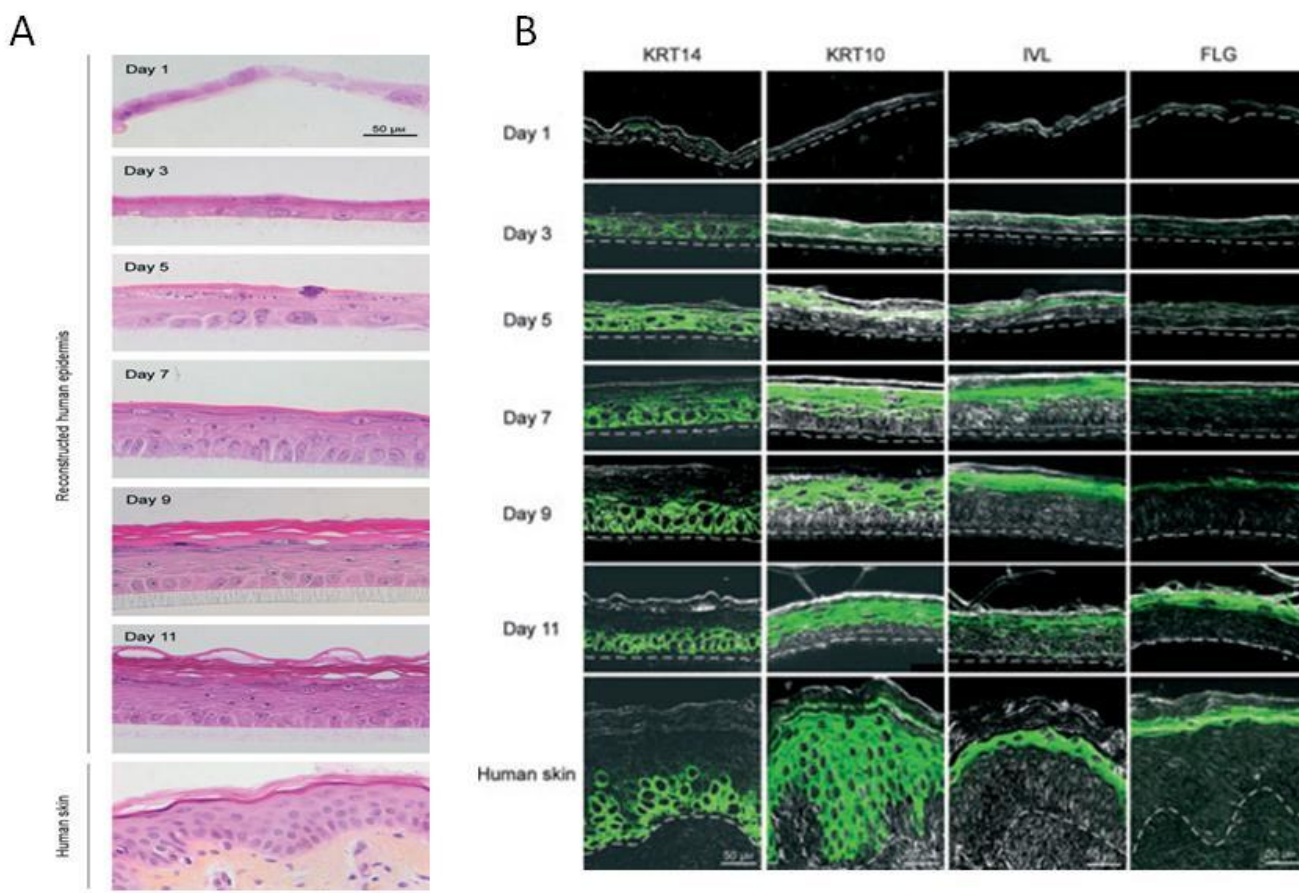
La culture en monocouche est une culture en deux dimensions où les cellules sontensemencées sur des boîtes de taille choisie. L'avantage de ce type de culture est la possibilité de visualiser de manière directe, par microscopie, l'état de confluence des kératinocytes. La confluence correspond au moment où les cellules recouvrent toute la surface de la boîte de culture. La caractérisation de ce modèle a permis de démontrer que les kératinocytes prolifèrent jusqu'au stade de confluence, puis entrent en différenciation dans les stades post-confluents. En effet, l'analyse du profil d'expression de kératinocytes cultivés en monocouche a montré que l'expression des marqueurs de différenciation tels que la kératine 10, la filaggrine et la loricrine augmente avec la confluence (Poumay and Pittelkow 1995; Minner, Herphelin et al. 2010).

Par la suite, il a été montré que lorsque les cellules sont sous-confluentes, elles ont besoin, outre les apports nutritifs apportés par le milieu de culture, de facteurs de croissance tels que l'EGF et l'insuline, ainsi que l'extrait pituitaire bovin, permettant une prolifération optimale. Cependant, lorsque les kératinocytes atteignent une confluence d'environ 50%, ces facteurs de croissance peuvent être supprimés car les cellules acquièrent la capacité de proliférer de manière autocrine (Pittelkow, Cook et al. 1993).

### 5.2 La culture en trois dimensions: l'épiderme humain reconstruit

Le modèle en monocouche présente une facilité d'étude par la visualisation directe des cellules vivantes. Cependant l'inconvénient majeur de ce modèle est son éloignement par rapport aux conditions que l'on retrouve *in vivo*. De ce fait, et de manière complémentaire, des modèles en trois dimensions, permettant d'obtenir des tissus reconstruits stratifiés plus proches de la situation *in vivo*, ont été développés.

Le principe de la mise en culture d'épidermes humains reconstruits consiste à ensemençer des kératinocytes sur des inserts de polycarbonate présentant des pores pour permettre le transport des éléments nutritifs présents dans le milieu disposé sous l'insert (*figure 5.1*). Ce milieu est complété en facteurs de croissance, en vitamine C et en ions calcium pour permettre la croissance, la stratification et la différenciation des kératinocytes. L'interface air-liquide, réalisée 24 heures après l'ensemencement, permet l'établissement de la barrière épidermique. Après 11 jours de culture, l'épiderme reconstruit obtenu reproduit l'architecture retrouvée dans un



(Frankart *et al* 2012)

**Figure 5.2 : Epidermes reconstruits *in vitro* : analyse histologique et analyse des marqueurs de différenciation.** (A) Des sections en paraffine d'épidermes reconstruits à différents jours de culture (day 1 = 1 jour après l'ensemencement) colorées à l'hématoxyline et à l'éosine, montrent une reconstruction des différentes couches que l'on retrouve dans un épiderme humain normal. (B) l'analyse des marqueurs de différenciation par immunofluorescence montre un profil d'expression similaire entre les épidermes reconstruits et une peau humaine normale. KRT14 = kératine 14; KRT10 = kératine 10; IVL = involucrine et FLG = filaggrine.

épiderme humain *in vivo* constitué des différentes couches, c'est-à-dire les couches basale, épineuse, granuleuse et cornée (*figure 5.2 A*) (Poumay, Dupont et al. 2004; Poumay and Coquette 2007; Frankart, Malaisse et al. 2012).

D'un point de vue moléculaire, l'analyse de la localisation par immunomarquage des marqueurs de différenciation tels que la kératine 14, la kératine 10, l'involucrine et la filaggrine a permis de démontrer que ce modèle présentait une localisation de ces marqueurs et un processus de différenciation similaire à celui de la peau *in vivo*. (*figure 5.2 B*) (Frankart, Malaisse et al. 2012).



## 6 Objectifs du mémoire

La podoplanine est une protéine qui semble jouer un rôle important dans le développement tumoral et notamment dans le développement du carcinome spinocellulaire. En particulier, son implication dans le processus de la transition épithélio-mésenchymateuse semble controversée.

L'objectif principal de ce mémoire est donc de déterminer le rôle de la podoplanine dans l'invasion et la migration de kératinocytes cancéreux dans un modèle épidermique.

Pour atteindre cet objectif principal, différents points ont été abordés. Dans un premier temps, une caractérisation de l'expression de la podoplanine a été effectuée au niveau des kératinocytes normaux et cancéreux en fonction de leur stade de confluence pour analyser la modulation éventuelle de l'expression.

Dans un second temps, deux modèles de coculture de kératinocytes normaux et cancéreux ont été élaborés.

Le premier modèle est un modèle en monocouche permettant la visualisation directe des cellules. Cependant, ce premier modèle ne reproduit pas idéalement l'environnement tissulaire que l'on retrouve *in vivo*. C'est pourquoi un second modèle a été établi.

Dans ce second modèle, un modèle d'épiderme humain reconstruit a été développé. Ce modèle, constitué de kératinocytes normaux et cancéreux, permettra l'étude du rôle de la podoplanine dans un environnement épidermique en trois dimensions constitué des différentes couches retrouvées dans la situation *in vivo*.

C'est grâce à ces modèles que pourra être étudié, à la fois le comportement des kératinocytes cancéreux dans un environnement épidermique, mais aussi le rôle de la podoplanine dans l'invasion tumorale. Pour permettre de discriminer les kératinocytes cancéreux des normaux au sein de ces cocultures, les kératinocytes cancéreux ont été rendus fluorescents grâce à une infection avec des particules lentivirales contenant le gène de la GFP.





# Matériel et méthodes



# 1 Cultures de kératinocytes humains normaux et cancéreux

## Matériel :

- **Milieu Epilife complet**
  - o Milieu Epilife (Cascade Biologics, Mansfeld, UK)
  - o HKGS (human keratinocyte growth supplement, Cascade Biologics )
  - o Penicilline G 50 U/ml
  - o Streptomycine 50ug/ml
- **Milieu DMEM complet**
  - o Milieu DMEM (dubelcco's modified eagle's medium, Lonza, Verviers, Belgique)
  - o FBS (fetal bovine serum) 10 %
  - o Penicilline G 50 U/ml
  - o Streptomycine 50 µg/ml
- **Keratinocyte growth medium KGM-2**
  - o KBM-2 (Clonetics)
  - o BPE (bovine pituitary extract) 50 µg/ml
  - o hEGF (epidermal growth factor 10 ng/ml
  - o Insuline 5ug/ml
  - o Hydrocortisone 5.10<sup>-7</sup>
  - o Transferrine 5ug/ml
  - o Calcium 1.5 mM
- **Milieu pour la culture des épidermes reconstruits**
  - o Milieu Epilife complet
  - o Vitamine C (50 µg/ml)
  - o KGF (keratinocyte growth factor) (10 ng/ml)
  - o Calcium (1.5 mM)
- **Solution A**
  - o Hepes 30 mM
  - o Glucose 10mM
  - o KCl 3mM
  - o NaCl 130mM
  - o Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1mM
  - o Rouge phenol 0.0033 mM
- **Trypsine T17**
  - o Solution A
  - o Trypsine 0.17% (Sigma)
- **Trypsine T25**
  - o Solution A,
  - o trypsin 0.025% (Sigma)
  - o EDTA 0.01%
- **Solution bloquante**
  - o Solution A
  - o Sérum foetal de veau dialysé 2%
- **Antibiotiques**
  - o Gentamycine (50 mg/ml)
  - o Fungizone (250 µg/ml)
  - o Ampicilline (250 µg/ml)

## Méthode :

### 1.1 Culture de kératinocytes humains normaux

#### 1.1.1 Culture primaire

Des échantillons de peau humaine sont obtenus à partir d'abdominoplasties réalisées par le docteur B. Bienfait (clinique St Luc, Bouge). Ces échantillons sont sectionnés au dermatome pour récupérer la couche superficielle et sont plongés dans une solution physiologique à 4°C. Les peaux sont ensuite coupées en morceaux qui sont incubés durant 24 heures dans une solution de trypsin T17, contenant de la gentamycine, de l'ampicilline et du fungizone, pour permettre la séparation du derme et de l'épiderme. L'épiderme ainsi détaché est placé dans le milieu de culture KGM-2 et décheté à l'aide de pinces de manière à dissocier les kératinocytes. La suspension cellulaire obtenue est alors filtrée puis centrifugée durant 10 minutes à 1000 rpm. Les kératinocytes sont ensuite ensemencés à raison de 46000



cellules/cm<sup>2</sup> dans du KGM-2. Après 3 jours de culture à 37°C, le milieu est remplacé par du milieu Epilife complet et les cellules sont cultivées jusqu'à atteindre 50% de confluence.

### *1.1.2 Culture secondaire*

Pour une amplification plus importante des kératinocytes, les cellules sont passées en culture secondaire. Pour cela, les kératinocytes sont incubés avec de la trypsine. Après 5 minutes d'incubation, une partie de la trypsine est aspirée pour éliminer les fibroblastes et les mélanocytes pouvant être encore présents dans la culture et qui se sont détachés plus vite que les kératinocytes. Les cellules sont ensuite incubées avec le reste de trypsine pendant environ 30 minutes pour permettre leur détachement. Une fois les cellules détachées, celles-ci sont récupérées dans une solution bloquante permettant de neutraliser l'action de la trypsine. Après une centrifugation de 5 minutes à 1000 rpm, les cellules sont resuspendues dans du milieu Epilife complet et sontensemencées à une densité de 10000 cellules/cm<sup>2</sup>. Lorsque les cellules ont atteint 60 % de confluence elles peuvent être congelées pour leur conservation. Pour cela les cellules sont détachées de la même manière, comptées et resuspendues dans du milieu Epilife complet (2.10<sup>6</sup> cellules par ml de milieu). Un volume équivalent de milieu de congélation est ensuite ajouté dans le but d'obtenir une densité cellulaire de 1.10<sup>6</sup> cellules/ml. Des aliquots de 1 ml sont ensuite placés dans des tubes de cryopréservation qui seront alors placés à une température de -80°C durant 24 heures puis seront finalement conservés dans de l'azote liquide.

### *1.1.3 Culture tertiaire = culture en monocouche*

Les kératinocytes sont décongelés etensemencés dans le milieu KGM-2. Le lendemain, le milieu est remplacé par du milieu Epilife complet. Lorsque les cellules sont à 70-80% de confluence, elles sont détachées par la trypsine et sontensemencées dans des boîtes de culture de 9.6 cm<sup>2</sup> à une densité de 8000 cellules/cm<sup>2</sup>. La culture peut être arrêtée à différents stades de confluence : sous-confluence, confluence et post-confluence.

### *1.1.4 Culture en épiderme reconstruit humain (RHE, reconstructed human epidermis)*

Les kératinocytes normaux sontensemencés sur des filtres de polycarbonate dans du milieu Epilife complet contenant une concentration en calcium de 1.5 mM. 24 heures après l'ensemencement, l'interface air-liquide est réalisée en enlevant le milieu dans le compartiment supérieur. Le milieu de culture présent en dessous des filtres est quant à lui remplacé par du milieu Epilife complet contenant du calcium (1.5mM), de la vitamine C (50µg/ml) et du KGF (10ng/ml). Le milieu est ensuite changé tous les 2 jours et les épidermes sont cultivés durant 11 jours pour permettre la reconstruction d'épidermes constitués des différentes couches retrouvées *in vivo*.

## **1.2 Culture de kératinocytes humains cancéreux**

Les kératinocytes cancéreux utilisés lors de ce mémoire sont les cellules A431 issues d'un carcinome spinocellulaire épidermique. Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM complet.

Lorsque les cellules ont atteint 70-80% de confluence, elles sont trypsinisées après rinçage avec de la solution A et sontensemencées dans des boîtes de cultures de 9.6 cm<sup>2</sup> à une densité cellulaire de 8000 cellules/cm<sup>2</sup>. Le milieu sera ensuite remplacé par du milieu Epilife complet, le milieu utilisé pour les expériences de coculture.



## 1.3 Coculture de kératinocytes cancéreux et normaux

### 1.3.1 Production de kératinocytes cancéreux GFP-positifs

Des particules lentivirales contenant le gène de la GFP (green fluorescent protein) ont été produites par Aurélie Hayez dans notre laboratoire. Les kératinocytes cancéreux A431 ont été infectés avec ces particules lentivirales pour induire l'expression stable de la GFP, permettant de les distinguer des kératinocytes normaux en microscopie à fluorescence.

### 1.3.2 Modèle de coculture en monocouche

Les kératinocytes normaux et cancéreux sont cultivés comme décrit précédemment. Lorsque les cellules des deux types cellulaires atteignent 70% de confluence, elles sontensemencées ensemble dans du milieu Epilife complet dans des boîtes de culture de 9.6 cm<sup>2</sup>. Les densités utilisées sont de 8000 pour les kératinocytes normaux et de 10, 50, 100, 500, et 1000 cellules/cm<sup>2</sup> pour les cellules A431.

### 1.3.3 Modèle de tumeurs épidermiques dans un épiderme reconstruit

Les cellules A431 sontensemencées simultanément avec les kératinocytes normaux sur des filtres de polycarbonate (Millipore, Brussels, Belgium) et sont cultivés de la même manière que les épidermes reconstruits décrits précédemment (point 1.4). Différents ratios ont été choisis pour l'ensemencement des cellules A431 : 1/10; 1/50; 1/100 et 1/500 cellules A431/kératinocytes normaux.

## 2 Traitement des kératinocytes

### 2.1 Traitement des kératinocytes par l'EGF (epidermal growth factor)

#### Matériel :

- EGF recombinant (R&D Systems, Minneapolis, USA)

#### -Milieu sans sérum

- Milieu Epilife (Cascade Biologics, Mansfeld, UK)
- Acides aminés (phénylalanine, histidine, tryptophane)
- Hydrocortisone
- Pénicilline G 50 U/ml
- Streptomycine 50 µg/ml

#### Méthode :

Les kératinocytes, normaux ou cancéreux, sontensemencés à une densité cellulaire de 8000 cellules/cm<sup>2</sup>. Lorsque les cellules atteignent le degré de confluence voulu, elles sont rincées dans de la solution A et incubées durant 2 heures dans du milieu sans sérum à 37°C. Après ces 2 heures d'incubation les cellules sont incubées avec une solution contenant de l'EGF. Deux concentrations d'EGF (1 ng/ml et 10 ng/ml) ont été choisies ainsi que différentes durées





d'incubation (5, 15, 30, 60 et 120 minutes). Le milieu est ensuite aspiré et les cellules sont congelées à -80°C pour l'extraction ultérieure des protéines.

## **2.2 Traitement des kératinocytes par des inhibiteurs du récepteur de l'EGF**

### **Matériel :**

- Inhibiteur PD153035 (AG1517, A.G. Scientific)
- Inhibiteur AG1478 (CalBiochem, USA)
- Clone LA1 (anticorps neutralisant, Millipore)

### **Méthode :**

Les kératinocytes normaux et/ou cancéreux sont ensemencés à une densité de 8000 cellules/cm<sup>2</sup>. Deux jours avant la confluence (C-2), ou à confluence (C), les cultures sont rincées et incubées pendant deux heures dans du milieu sans sérum. Elles sont ensuite incubées avec des inhibiteurs du récepteur de l'EGF durant 30 min, puis traitées ou non avec de l'EGF pendant 24 heures.

Trois inhibiteurs du récepteur de l'EGF sont utilisés ; l'inhibiteur PD153035 et l'inhibiteur AG1478 qui empêchent tous les deux la phosphorylation du domaine tyrosine kinase du récepteur, et le LA1 qui est un anticorps neutralisant le récepteur en interagissant avec le domaine extracellulaire.

## **3 Quantification du matériel cellulaire vivant**

### **3.1 Test MTT**

#### **Matériel :**

- Solution de MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium bromide, Sigma)
- Milieu sans sérum
- Isopropanol

#### **Principe :**

L'influence de l'EGF et de ses inhibiteurs sur la population cellulaire est évaluée par le test MTT. Ce test est basé sur une mesure colorimétrique. En effet, lorsque les cellules vivantes sont en présence de MTT, celui-ci est transporté dans les mitochondries et métabolisé, lorsque les cellules sont métaboliquement actives, en un précipité coloré : le formazan.

#### **Méthode :**

Le MTT est d'abord dissout dans du milieu de culture pour obtenir une concentration de 0.5mg/ml. Le milieu des cellules est aspiré et remplacé par le milieu contenant la solution MTT. Les cellules sont incubées dans cette solution pendant 1 heure à 37°C puis le milieu



MTT est remplacé par de l'isopropanol pour permettre la dissolution du précipité. L'isopropanol est ensuite prélevé et transféré dans une plaque 96 puits pour permettre la mesure spectrophotométrique à 540 nm. L'intensité de la coloration obtenue après solubilisation du précipité est donc proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

## 3.2 Comptage cellulaire

### Matériel :

- **Paraformaldéhyde 4% (PFA 4%)**
  - o PBS
  - o Paraformaldéhyde
- **PBS-glycine**
  - o PBS/ABC
  - o Glycine 0.1M
- **PBS/ BSA**
  - o PBS
  - o BSA 0.1 %
- **Hoechst**
- **mowiol**

### Méthode :

Les cellules sont fixées durant 15 minutes dans de la PFA 4%. Elles sont ensuite rincées puis incubées pendant 2x3 minutes dans du PBS-glycine 0.1M pour éliminer les aldéhydes encore présents. Les cellules sont ensuite incubées pendant 30 minutes avec un tampon PBS/BSA. Les noyaux sont ensuite marqués avec le Hoechst. Les cellules sont montées au Mowiol, puis analysées au microscope.

## 4 Analyse de l'expression de l'ARN messager par PCR quantitative en temps réel

### Matériel :

- Roche high pure RNA isolation kit (Roche,Diagnostic,Manheim,Germany)
- Nanodrop 1000 (thermo scientific,USA)
- Kit super script II RNase H-reverse transcriptase (Invitrogen,Merelbeke,Belgium)
- Oligo DT(0.5 µg/µl) (Invitrogen)
- DTT 0.1M (Dithiothréitol) (Invitrogen)
- Tampon first strand (5X) : tris-HCl 250mM, KCl 375 mM,MgCl<sub>2</sub> 15mM
- SYBR Green master mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
- dNTPs 10mM
- Real time PCR 7300 system software (Applied Biosystems)
- Plaque MicroAmp (Applied Biosystems,Lennik,Belgium)
- Eau RNase free

### Méthode :

## 4.1 Extraction de l'ARN

L'extraction d'ARN est effectuée par l'utilisation du kit « high pure isolation RNA ». Les cellules sont d'abord lysées à l'aide du tampon de lyse. Les lysats sont ensuite récupérés et

Amorces	Podoplanine	RPLP0
Sens	5' - ACCAGTCACTCCACGGAGAAA-3'	5' - ATCAACGGGTACAAACGAGTC-3'
Antisens	5' - AACCAGGGTCACTGTTGACAAA-3'	5' - CAGATGGATCAGCCAAGAAGG-3'

**Tableau 1:** Séquences des amorces utilisées lors de la RT-PCR

transférés sur une colonne permettant l'accrochage des acides nucléiques, puis centrifugés pour éliminer les protéines et les sels. Une incubation de 15 minutes avec une solution de DNase est ensuite réalisée dans le but de dégrader l'ADN présent dans le lysat. Après l'incubation, différentes étapes de lavages sont effectuées. La dernière étape consiste en l'addition du tampon d'élution suivie d'une centrifugation permettant de récupérer l'ARN.

La concentration en ARN est alors mesurée à l'aide du Nanodrop par une mesure spectrophotométrique à 260 nm.

## 4.2 Rétro-transcription

Pour réaliser la PCR, l'ARN obtenu lors de l'extraction doit être rétro-transcrit en ADN complémentaire. Pour ce faire, dans une première étape, un mix constitué d'oligodT, de dNTP et d'eau RNase-free est ajouté à 1 µg d'ARN et une incubation de 5 minutes à 65 °C est effectuée de manière à déplier l'ARN. Dans une seconde étape, un second mix constitué de tampon first-strand, de DTT et de la reverse transcriptase est ajouté aux échantillons et la reverse transcription peut alors être effectuée par une incubation de 50 minutes à 42°C suivie d'une incubation de 15 minutes à 70°C pour inactiver l'enzyme. L'ADN complémentaire obtenu peut alors être conservé à -20°C.

## 4.3 PCR en temps réel

Pour réaliser la PCR, un mix, constitué de SYBRgreen et des amorces spécifique aux gènes d'intérêt étudiés (**tableau 1**), est ajouté à l'ADN complémentaire obtenu lors de la rétro-transcription. L'amplification est ensuite réalisée par l'utilisation de l'appareil « 7300 RT-PCR ».

# 5 Analyse de l'abondance protéique par Western blot

### Matériel:

- **Tampon de lyse**
  - Tris-HCl 62.5mM
  - SDS 2%
  - Glycérol 10%
  - Bleu de bromophénol 0.05 %
  - DTT(DL-Dithiothreitol,Sigma)0.1M
- **BSA** : bovine serum albumin (20mg/ml)
- **Pierce kit** (Thermo scientific, Rockford, USA)
- **Running gel**
  - Tris base 375 mM à pH 8.8
  - SDS 0.1%
  - Acrylamide/bisacrylamide 10%
  - APS (persulfate d'amonium) 0.05%
  - TEMED 0.1%
- **Stacking gel**
  - Tris base 125 mM pH 8.8
- SDS 0.1%
- Acrylamide/bisacrylamide 4%
- APS (persulfate d'amonium) 0.05%
- TEMED 0.1%
- **Tampon d'électrophorèse**
  - Tris base 25 mM
  - Glycine 192 mM
  - SDS 0.1 %
- **Tampon de transfert**
  - Tris base 25 mM
  - Glycine 192 mM
  - Méthanol 20%
- **Tampon PBS**
  - NaCl 136.86 mM
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.09 mM
  - KCl
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Anticorps	Dilution	Temps d'incubation	Source et isotype	provenance
Podoplanine	1/500	Overnight	Souris monoclonal	DAKO
RPL13a	1/1000	Overnight	Lapin-polyclonal	Cell Signaling
EGFR total	1/1000	1h30	Lapin-polyclonal	Cell Signaling
P-EGFR	1/1000	1h30	Lapin-polyclonal	Invitrogène

**Tableau 2:** Liste et caractéristiques des anticorps primaires utilisés pour la détection des protéines lors du Western blot

- **Solution de rinçage**
  - PBS
  - Tween-20 0.1%
- **Solution bloquante**
  - PBS
- Tween-20 0.1%
- Lait écrémé 5%
- **BM chemiluminescence blotting substrate**  
(Roche diagnostic, Mannheim, Germany)
- **Imagequant350** (General Electric)

## Méthode :

### 5.1 Extraction des protéines

Les cellules sont lysées à l'aide du tampon de lyse, puis le lysat cellulaire est récupéré et chauffé pendant 5 minutes. Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant de la BSA (bovine serum albumin) à différentes concentrations : 4 µg/µl, 2 µg/µl, 1 µg/µl, 0.5 µg/µl et 0.25 µg/µl. Le réactif du kit Pierce est ajouté aux échantillons et à l'étalon. La densité optique est alors mesurée à 660 nm pour l'étalon et les échantillons.

### 5.2 Western blot

La première étape consiste en une électrophorèse. Pour cela, 10 µg de protéines sont chargés sur un gel de polyacrylamide contenant du SDS (constitué du running gel et du stacking gel). Les protéines migrent suivant leur poids moléculaire, et le bleu de bromophénol ajouté aux échantillons permet de suivre cette migration. Cette étape s'effectue dans le tampon d'électrophorèse à 100 volts pendant environ 1h30. La seconde étape est le transfert de ces protéines sur une membrane de polyvinylidène difluoride immergée dans le tampon de transfert pendant environ 2 heures à 100 volts. La membrane est ensuite saturée avec la solution de rinçage contenant 5% de lait. La membrane est incubée avec l'anticorps primaire spécifique du gène d'intérêt (**tableau 2**), dilué dans du PBS tween (0.1%) contenant 5 % de lait. Après cette incubation, la membrane est rincée plusieurs fois puis incubée avec l'anticorps secondaire pendant 1h30 (anti-lapin ou anti-souris, dilution 1/1000). Pour permettre la détection des protéines d'intérêt, le substrat de Chemiluminescence (BM Chemiluminescence Blotting Substrate Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) est utilisé et la révélation est effectuée par l'utilisation de l'Imagequant350.

## 6 Préparation des échantillons pour la microscopie

### 6.1 Marquage par réaction immunoperoxydasique

#### Matériel :

- **Formol acétique 4%**
- **PBS/ABC**
  - H<sub>2</sub>O distillée
  - CaCl<sub>2</sub> 0.9 mM
  - KCl 2 mM
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4 mM
  - MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM
  - NaCl 0.13M
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 8 mM
- **PBS/ABS-BSA-triton**
  - PBS/ABC
  - BSA 0.1%
  - Triton 0.02%
- **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%**
- **PBS/ABC-BSA**
  - PBS/ABC
  - BSA 0.1 %
- **PBS/ABC-glycine**





- PBS/ABC
- Glycine 0.1M
- **Hémalun**
- **Anticorps primaire :** anti-podoplanine (dilution 1/200. Clone D2-40, DAKO)
- **Anticorps secondaire :** anti-souris biotinylé (peroxydase IgG Vectastain ABC kit-Vector Laboratories)
- **DPX**
- **Chromogène DAB** (DAKO)
- **Hoechst** (dilution 1/100)
- **To-pro** (dilution 1/80 dans une solution RNase free)

### Méthode :

Les épidermes reconstruits sont fixés dans une solution de formol acétique 4% puis sont déshydratés et enrobés en paraffine. Des sections de 6 µm d'épaisseur sont produites et sont déparaffinées, réhydratées et immergées dans un tampon citrate à 96°C pendant 20 minutes, puis rincées dans du PBS/ABC. Les aldéhydes encore fonctionnels sont éliminés par 3 bains de 2 minutes dans du PBS/ABC glycine. Après rinçage, les coupes sont incubées pendant 10 minutes avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% pour éliminer les peroxydases endogènes. Les coupes sont ensuite bloquées et perméabilisées par du PBS/ABC-BSA-triton durant 30 minutes, puis sont incubées toute la nuit avec l'anticorps primaire anti-podoplanine (anti-podoplanine dilution 1/200). Après une étape de rinçage, les coupes sont incubées durant 45 minutes avec l'anticorps secondaire biotinylé, puis incubées pendant 45 minutes avec le mélange streptavidine-peroxydase (Vectastain). La détection est alors effectuée à l'aide du chromogène. Les coupes sont finalement contre colorées avec l'hémalun pour marquer les noyaux des cellules et rincées à l'eau de ville courante avant d'être montées au DPX.

## 6.2 Marquage par immunofluorescence

### Matériel :

- PBS/ABC
- PBS/ABC-glycine 0.1 M
- PBS/ABC-BSA
- PFA 4%
- **Anticorps primaire :** anti-podoplanine (dilution 1/200, DAKO)=
- **Anticorps secondaire :** anti-souris couplé à une sonde Alexa fluor
- **Hoechst** (dilution 1/100)
- **To-pro** (dilution 1/80 dans une solution RNase)

### Méthode :

Dans le cas de marquages en immunofluorescence sur des cellules, les cultures cellulaires sont réalisées de la même manière que décrite précédemment, mais les kératinocytes sont, dans ce cas-ci,ensemencés sur des lamelles. Les kératinocytes sont fixés toute la nuit à différents stades de confluence dans de la PFA 4%. Après la fixation, les cellules sont rincées dans du PBS/ABC puis incubées durant 2X3 minutes dans du PBS/ABC glycine pour éliminer les aldéhydes encore fonctionnels. Les cellules sont rincées puis incubées durant 30 minutes avec du PBS/ABC-BSA pour bloquer les sites de liaison non spécifiques. Les cellules sont ensuite incubées toute la nuit avec l'anticorps primaire en chambre humide à 4°C. Après rinçage dans du PBS/ABC, les cellules sont incubées pendant une heure avec l'anticorps



secondaire couplé à une sonde fluorescente *Alexa* (dilution 1/200). Les noyaux sont ensuite marqués avec du Hoechst ou du To-pro.

### **6.3 Préparation des tissus entiers pour la microscopie confocale**

#### **Matériel :**

- **PFA 4%**
- **PBS/triton**
  - PBS
  - Triton 0.02 %
- **To-pro** (dilution 1/80 dans une solution RNase)
- **Mowiol**

#### **Méthode :**

Les épidermes reconstruits sont fixés à différents stades de reconstruction dans de la PFA 4% pendant 30 minutes. Les épidermes sont ensuite rincés puis sont incubés pendant 30 minutes dans du PBS/triton. Les noyaux sont marqués avec le To-pro pendant 20 minutes. Les épidermes sont ensuite rincés. Pour terminer les filtres sont découpés de leur support et sont placés entre lame et lamelle avec du Mowiol.

### **6.4 Préparation des cultures pour l'analyse au BD pathway**

#### **Matériel :**

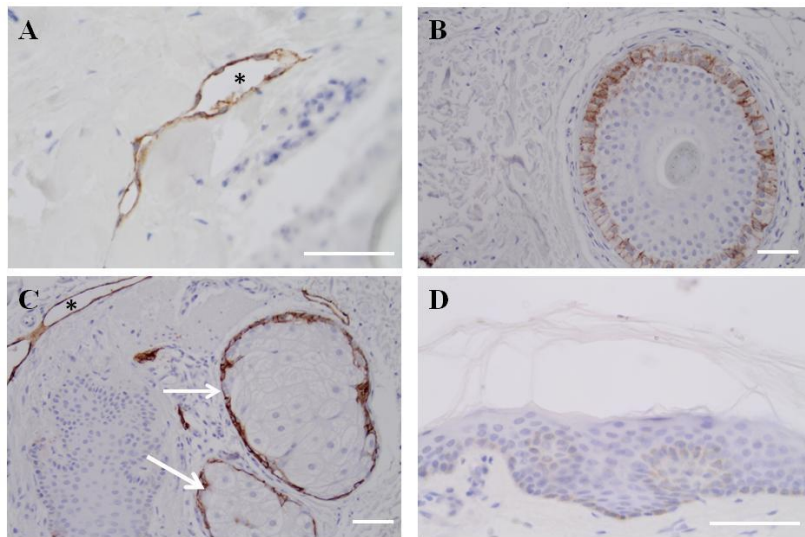
- **PFA 4%**
- **Anticorps anti-turbo GFP** (dilution 1/500, Thermo Scientific)
- **Hoechst** (dilution 1/100)
- **BD pathway**

#### **Méthode :**

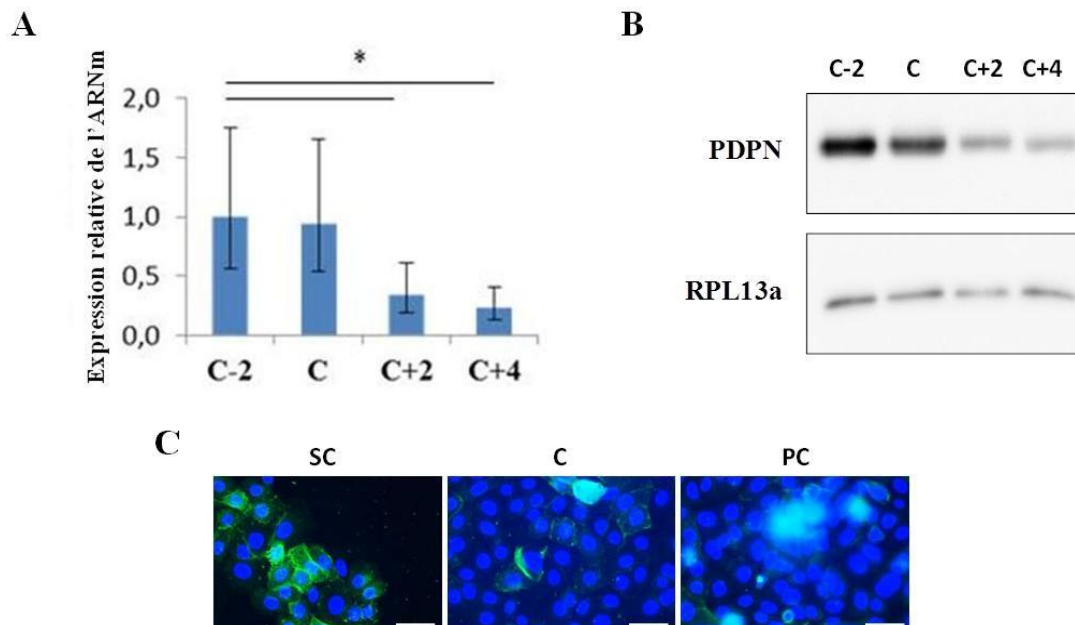
Les cocultures sont fixées dans de la PFA 4 % durant 20 minutes, puis sont rincées et incubées avec l'anticorps turbo-GFP. Un marquage des noyaux est également effectué avec du Hoechst. Ces cocultures sont ensuite analysées par la technique du BD pathway pour permettre d'analyser et de quantifier la proportion de kératinocytes cancéreux.



# Résultats



**Figure 1.1 : Détection de la podoplanine dans une peau humaine normale.** Des coupes en paraffine de peau humaine normale ont été marquées par immunoperoxydase avec l'anticorps anti-podoplanine et ont été contre-colorées par l'hémalum. (A) vaisseau lymphatique, (B) follicule pileux, (C) glandes sébacées, (D) épiderme interfolliculaire. Barres d'échelle = 50  $\mu$ m



**Figure 1.2 : Caractérisation de l'expression et de la localisation de la podoplanine dans des kératinocytes normaux.** (A) l'ARN a été extrait de cultures cellulaires interrompues deux jours avant la confluence (C-2), à confluence (C), deux (C+2) et quatre (C+4) jours après la confluence. Une analyse de l'ARN messager a été réalisée par qRT-PCR. Les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport à RPLP0 et le stade de confluence C-2 a été fixé arbitrairement à 1. L'expérience a été réalisée en triplicats. Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance de 95 %. Un test ANOVA 2 a été effectué et les résultats présentent une différence significative (**B**) Les protéines ont été extraites des cultures aux différents stades de confluence et l'abondance protéique a été analysée par Western blot. RPL13a a été utilisé comme marqueur de charge. (**C**) Un immunomarquage a été réalisé sur des cellules sous-confluentes (SC), confluentes (C) et post-confluentes (PC). Un anticorps anti-podoplanine a été utilisé (en vert) et les noyaux ont été marqués par le Hoechst (en bleu) Barres d'échelle = 50  $\mu$ m

# 1 Caractérisation de l'expression de la podoplanine

L'objectif final de ce mémoire est de réaliser un modèle de carcinome spinocellulaire au sein d'un environnement épidermique permettant l'étude du rôle de la podoplanine. Auparavant, il est nécessaire de caractériser l'expression de cette protéine au niveau des kératinocytes, que ce soit dans des conditions normale ou cancéreuse.

## 1.1 Caractérisation de l'expression de la podoplanine en condition normale

### 1.1.1 Détection de la podoplanine *in vivo* dans la peau humaine

La podoplanine est une protéine transmembranaire exprimée dans de nombreux tissus et organes dont les vaisseaux lymphatiques, le cœur, les poumons ou encore le pancréas (Raica, Cimpean et al. 2008).

Nous avons premièrement caractérisé l'expression de la protéine *in vivo* dans une peau humaine normale. Pour cela, la podoplanine a été détectée par immunomarquages sur des sections en paraffine de peaux humaines. Les résultats montrent que l'immunoréactivité est détectée au niveau des vaisseaux lymphatiques ainsi qu'au niveau de la couche basale de structures épithéliales comme les follicules pileux et les glandes sébacées. À l'inverse, la podoplanine n'est pas présente dans l'épiderme interfolliculaire humain (*figure 1.1*). Ces premiers résultats confirment les résultats provenant de la littérature (Raica, Cimpean et al. 2008; Astarita, Acton et al. 2012).

### 1.1.2 Détection de la podoplanine dans des kératinocytes normaux en culture

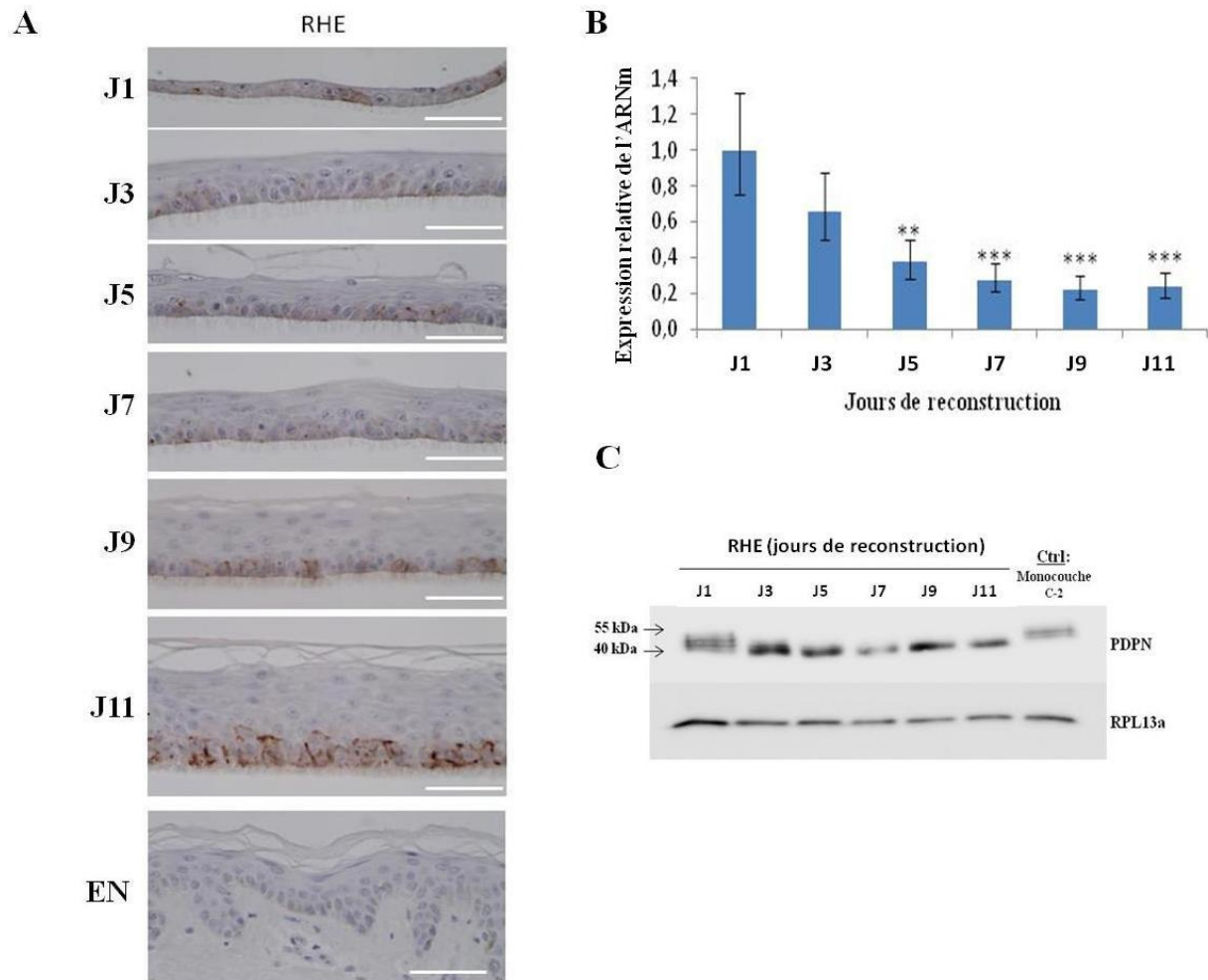
Les précédents résultats ont montré que la podoplanine n'est pas exprimée dans un épiderme humain en condition normale. Cependant les expériences que nous avons réalisées pour développer le modèle sont des études *in vitro*. C'est pourquoi nous avons analysé l'expression de la podoplanine dans des kératinocytes normaux en culture.

Pour cela des kératinocytes humains obtenus à partir d'abdominoplasties ont été utilisés. Ces kératinocytes normaux ont étéensemencés dans du milieu Epilife complet à une densité de 8000 cellules/cm<sup>2</sup> et ont été cultivés jusqu'à différents stades de confluence afin d'analyser la modulation de l'expression en fonction de la densité cellulaire. Les cultures ont été interrompues deux jours avant la confluence (C-2), à confluence (C), et deux (C+2) ou quatre (C+4) jours après la confluence.

Une analyse de l'expression de l'ARN messager a été réalisée par PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) et les résultats montrent une diminution significative de l'expression de l'ARN messager de la podoplanine avec la confluence (*figure 1.2A*).

Dans une seconde étape, nous avons analysé l'expression protéique de la podoplanine aux différents stades de confluence par Western blot (*figure 1.2B*). Les résultats de cette analyse nous ont permis d'observer une diminution de l'expression protéique avec la confluence, ce qui concorde avec les résultats obtenus pour l'expression de l'ARN messager.





**Figure 1.3 : Caractérisation de l'expression et de la localisation de la podoplanine dans des épidermes reconstruits *in vitro*.** Des épidermes reconstruits ont été cultivés pendant différentes durées de reconstruction (J1 = 1<sup>er</sup> jour après l'ensemencement). **(A)** Des coupes en paraffine d'épidermes reconstruits et de peau humaine (EN) ont été marquées par immunoperoxydase avec l'anticorps anti-podoplanine et ont été contre-colorées avec l'hémalun. **(B)** Les ARN ont été extraits à partir d'épidermes à chaque stade de reconstruction, et l'expression de l'ARN messager a été analysée par qRT-PCR. Les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport à RPLP0 et le stade J1 a été fixé arbitrairement à 1. L'expérience a été réalisée en triplicats. Intervalles de confiance de 95 %. Un test ANOVA 2 a été effectué et les résultats ont montré une différence hautement significative. **(C)** Les protéines ont été extraites à partir des épidermes à chaque stade de reconstruction, et l'abondance protéique a été analysée par Western blot. RPL13a a été utilisé comme marqueur de charge. Un contrôle a été utilisé (monocouche C-2). Barre d'échelle = 50  $\mu$ m

Pour terminer, un immunomarquage sur des cellules sous-confluentes (SC), confluentes (C) et post-confluentes (PC), confirme les résultats précédents, et présente une diminution du signal avec la confluence. De plus, ce marquage permet également d'observer que la podoplanine a une localisation péricellulaire et cytoplasmique (*figure 1.2C*).

Ces trois expériences démontrent que les kératinocytes ont la capacité d'exprimer la podoplanine et que cette expression est dépendante de l'état de confluence. Cette capacité est particulièrement surprenante puisque la podoplanine n'est pas exprimée *in vivo* dans l'épiderme interfolliculaire.

### 1.1.3 Caractérisation de l'expression de la podoplanine dans des épidermes reconstruits

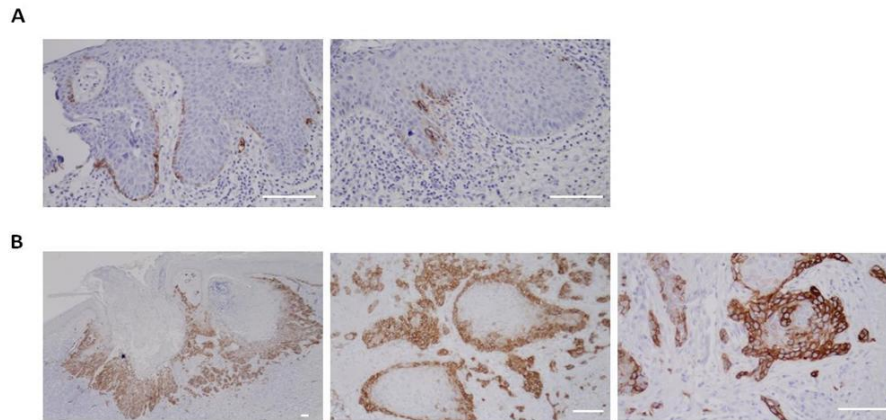
Nous avons observé une expression de la podoplanine dans des kératinocytes normaux en culture alors que cette protéine n'est pas présente dans un épiderme *in vivo*. Toutefois, la culture en monocouche est peu représentative de la situation *in vivo*. La reconstruction d'épidermes *in vitro* permet, quant à elle, une approche plus comparable à la situation *in vivo*. Nous nous sommes donc intéressés à analyser l'expression de la podoplanine dans des épidermes reconstruits à différents stades de reconstruction.

Pour rappel, le principe de reconstruction d'épidermes *in vitro* consiste en l'ensemencement de kératinocytes sur des filtres de polycarbonate. L'interface air-liquide réalisée ensuite permet l'établissement de la barrière épidermique, la stratification et l'obtention d'un tissu reconstruit après 11 jours de culture. Des épidermes ont été fixés à différents stades de reconstruction, inclus et enrobés en paraffine. Des sections ont ensuite été marquées par immunoperoxydase avec un anticorps anti-podoplanine. Les résultats montrent la présence d'une immunoréactivité au niveau de la couche basale, dont l'intensité augmente en fonction du degré de reconstruction (*figure 1.3A*).

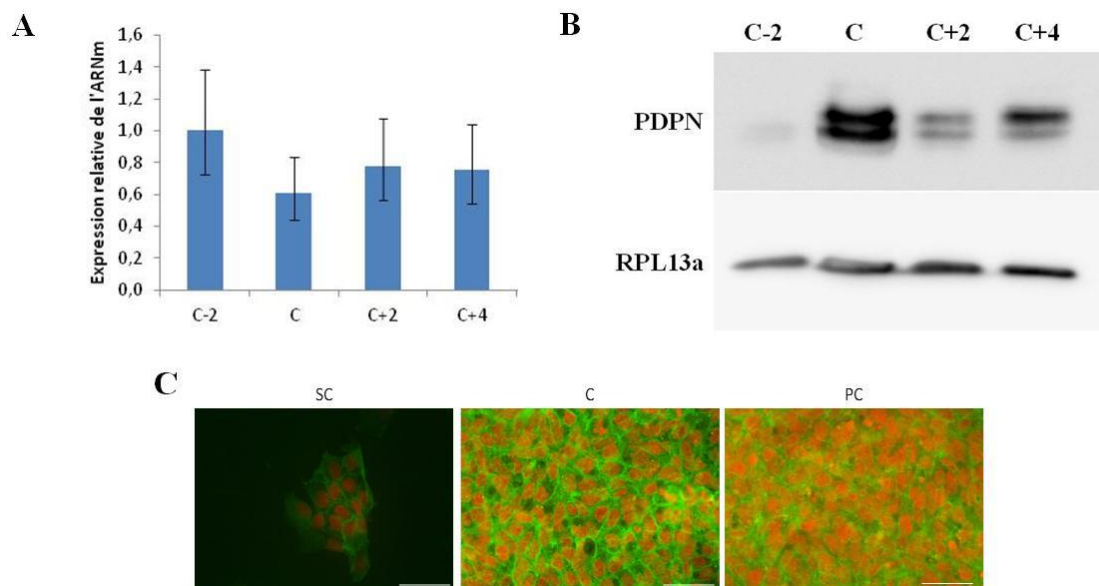
Le modèle d'épiderme reconstruit étant proche de la situation *in vivo*, il est étonnant d'y observer une expression de la podoplanine, alors qu'il n'y a pas d'expression *in vivo* dans un épiderme humain normal.

Dans un second temps, une analyse de l'expression de l'ARN messager de la podoplanine par qRT-PCR a été réalisée sur les épidermes reconstruits aux mêmes stades de reconstruction (*figure 1.3B*). Les résultats permettent de confirmer l'expression de la podoplanine dans l'épiderme reconstruit. Par contre, la quantité relative d'ARN messager de la podoplanine diminue de manière significative avec le degré de reconstruction, ce qui s'oppose aux résultats obtenus en immunomarquage. Cette contradiction peut s'expliquer du fait que la podoplanine n'est présente que dans la couche basale. Lorsqu'on analyse l'expression de l'ARN messager il n'y a pas de distinction entre les différentes couches, qui sont rassemblées dans le même échantillon. Puisque le nombre de couches augmente avec la reconstruction et que la podoplanine n'est exprimée qu'au niveau de la couche basale, il y a proportionnellement moins d'ARN messager de la podoplanine dans des tissus plus avancés dans la reconstruction, et comportant donc plus de couches.

Pour terminer, une analyse de l'expression des protéines de la podoplanine a été réalisée par Western blot (*figure 1.3C*). Les résultats montrent que la podoplanine est exprimée à chaque stade de reconstruction et a un niveau d'expression constant. De plus, à partir du 3<sup>ème</sup> jour de reconstruction on observe une réduction de la taille de la protéine, en comparaison avec les kératinocytes en monocouche et lors du 1<sup>er</sup> jour de reconstruction épidermique (J1). Cette différence pourrait s'expliquer par une modification de l'état de glycosylation de la



**Figure 1.4 : Caractérisation de l'expression de la podoplanine dans des carcinomes spinocellulaires épidermiques.** Des coupes en paraffine de carcinomes spinocellulaires ont été marquées par immunoperoxydase avec l'anticorps reconnaissant la podoplanine et ont été contre-colorées avec l'hémalun. **(A)** Carcinome spinocellulaire *in situ* **(B)** Carcinome spinocellulaire invasif. Barres d'échelle = 100 µm



**Figure 1.5 : Caractérisation de l'expression et de la localisation de la podoplanine dans des cellules A431 cultivées dans du milieu DMEM complet.** **(A)** Les ARN ont été extraits de cultures cellulaires interrompues deux jours avant la confluence (C-2), à confluence (C) et deux (C+2) ou quatre (C+4) jours après la confluence. L'expression de l'ARN messenger a été analysée par qRT-PCR. Les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport à RPLP0 et le stade C-2 a été fixé à 1. L'expérience a été réalisée en triplicats. Intervalles de confiance à 95 %. Un test ANOVA 2 a été réalisé et aucune différence significative n'a été observée. **(B)** Les protéines ont été extraites à partir de cultures interrompues aux différents stades de confluence et l'abondance protéique a été analysée par Western blot. RPL13a a été utilisé comme marqueur de charge. **(C)** Un immunomarquage a été réalisé sur des cellules sous-confluentes (SC), confluentes (C) et post-confluentes (PC) en utilisant un anticorps reconnaissant la podoplanine (en vert). Les noyaux ont été marqués avec le To-pro (en rouge) Barres d'échelle = 50 µm

podoplanine. En effet, le domaine extracellulaire de la podoplanine contient des résidus sérines et thréonines pouvant subir des O-glycosylations. Une modification de la glycosylation de la podoplanine engendrerait une différence de taille de la protéine détectée par Western blot.

## **1.2 Caractérisation de l'expression de la podoplanine dans des cellules cancéreuses**

Dans la première partie, nous avons caractérisé l'expression de la podoplanine dans des cellules normales. Cependant, nous voulons dans la suite de ce travail étudier le comportement de kératinocytes cancéreux. C'est pourquoi il nous a fallu également décrire et caractériser l'expression de la podoplanine en conditions cancéreuses *in vivo* puis *in vitro*.

### *1.2.1 Caractérisation de l'expression de la podoplanine in vivo dans des carcinomes spinocellulaires*

Comme décrit précédemment, il a été démontré dans plusieurs études que la podoplanine est une protéine exprimée dans la plupart des cancers et particulièrement dans les carcinomes spinocellulaires (Schacht, Dadras et al. 2005; Martin-Villar, Megias et al. 2006). Dans le but de confirmer cela, nous avons réalisé un immunomarquage de la podoplanine sur des sections de carcinomes spinocellulaires épidermiques (*figure 1.4*). Deux types de carcinomes ont été utilisés ; le carcinome spinocellulaire *in situ* et le carcinome spinocellulaire invasif.

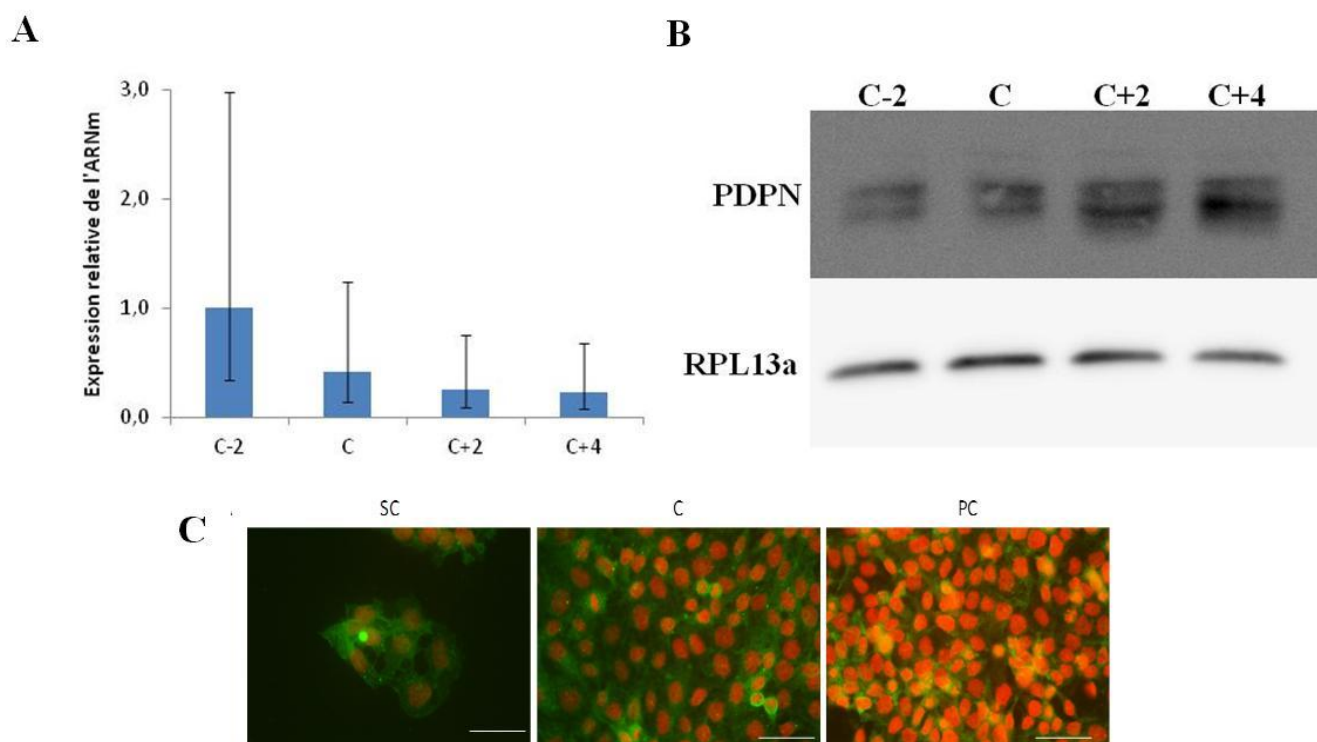
D'une part, les résultats nous ont permis de confirmer l'expression de la podoplanine dans les carcinomes spinocellulaires épidermiques. D'autre part, il semblerait que la podoplanine ait un taux d'expression différent en fonction du degré d'invasivité du carcinome spinocellulaire. En effet, l'expression dans le carcinome spinocellulaire *in situ* est restreinte et est localisée au niveau de la couche basale de l'épiderme lésionnel. Par contre, cette expression est plus importante dans le carcinome spinocellulaire invasif où elle s'étend aux couches supra-basales de l'épiderme lésionnel au niveau du front de progression tumorale. Ces observations confirment également des résultats présents dans la littérature, qui démontrent une expression de la podoplanine plus importante dans les carcinomes spinocellulaires invasifs et plus particulièrement au niveau du front de progression tumorale (Schacht, Dadras et al. 2005).

### *1.2.2 Caractérisation de l'expression de la podoplanine dans des kératinocytes cancéreux en culture*

Puisque l'intérêt est d'étudier le phénotype des cellules *in vitro*, il est nécessaire de caractériser l'expression dans des cellules en culture. Pour cela, ce sont les cellules A431 qui ont été étudiées car elles proviennent d'un carcinome spinocellulaire épidermique. Ces cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM supplémenté en sérum de veau fœtal qui est le milieu classiquement utilisé pour la culture de ce type cellulaire.

Ces cellules ont été ensemencées à une densité de 8000 cellules/cm<sup>2</sup>, puis ont été cultivées jusqu'à différents stades de confluence : deux jours avant la confluence (C-2), à confluence (C), deux (C+2) et quatre (C+4) jours après la confluence dans le but d'analyser une possible modulation de l'expression de la podoplanine en fonction de la densité cellulaire.

Une analyse de l'expression de l'ARN messenger par qRT-PCR ne montre aucune différence significative de l'expression en fonction de la densité cellulaire (*figure 1.5A*).



**Figure 1.6 : Caractérisation de l'expression et de la localisation de la podoplanine dans des cellules A431 cultivées dans du milieu Epilife complet.** (A) Les ARN ont été extraits de cultures cellulaires interrompues deux jours avant la confluence (C-2), à confluence (C) et deux (C+2) ou quatre (C+4) jours après la confluence. L'expression de l'ARN messenger a été analysée par qRT-PCR. Les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport à RPLP0 et le stade C-2 a été fixé à 1. L'expérience a été réalisée en triplicats. Intervalles de confiance à 95 %. Un test ANOVA 2 a été réalisé et aucune différence significative n'a été observée. (B) Les protéines ont été extraites à partir de cultures interrompues aux différents stades de confluence et l'abondance protéique a été analysée par Western blot. RPL13a a été utilisé comme marqueur de charge. (C) Un immunomarquage a été réalisé sur des cellules sous-confluentes (SC), confluentes (C) et post-confluentes (PC) en utilisant un anticorps reconnaissant la podoplanine (en vert). Les noyaux ont été marqués avec le To-pro (en rouge) Barres d'échelle = 50  $\mu$ m

Une analyse de l'abondance protéique par Western blot a ensuite été effectuée (*figure 1.5B*). Les résultats montrent une tendance à une augmentation de l'expression de la podoplanine avec la confluence. La divergence entre ce résultat et celui obtenu en qRT-PCR pourrait être expliquée par une stabilité plus importante des protéines par rapport aux ARN messagers et à une possible accumulation de la protéine.

Pour terminer, un immunomarquage a été réalisé sur des cellules sous-confluentes (SC), confluentes (C), et post-confluentes (PC). Les résultats montrent que la podoplanine a une localisation péricellulaire, concordant avec le fait que la podoplanine est une protéine transmembranaire (*figure 1.5C*). Aucune évolution de l'intensité du signal ne peut être clairement identifiée en fonction du degré de confluence.

Nous avons donc pu confirmer une expression de la podoplanine *in vivo* dans des carcinomes spinocellulaires épidermiques. Nous avons également observé une expression de cette protéine *in vitro* dans des cultures de kératinocytes cancéreux en monocouches dans le milieu DMEM complet. Afin de compléter l'étude de l'expression de la podoplanine dans les kératinocytes cancéreux, nous avons, en outre, caractérisé cette expression dans des cultures de cellules A431 en monocouche cultivées dans du milieu Epilife complet. En effet, c'est ce milieu qui sera utilisé lors des étapes de cocultures. Les cellules A431 ont donc étéensemencées à une densité de 8000 cellules/cm<sup>2</sup> dans ce milieu et ont été cultivées jusqu'aux différents stades de confluence.

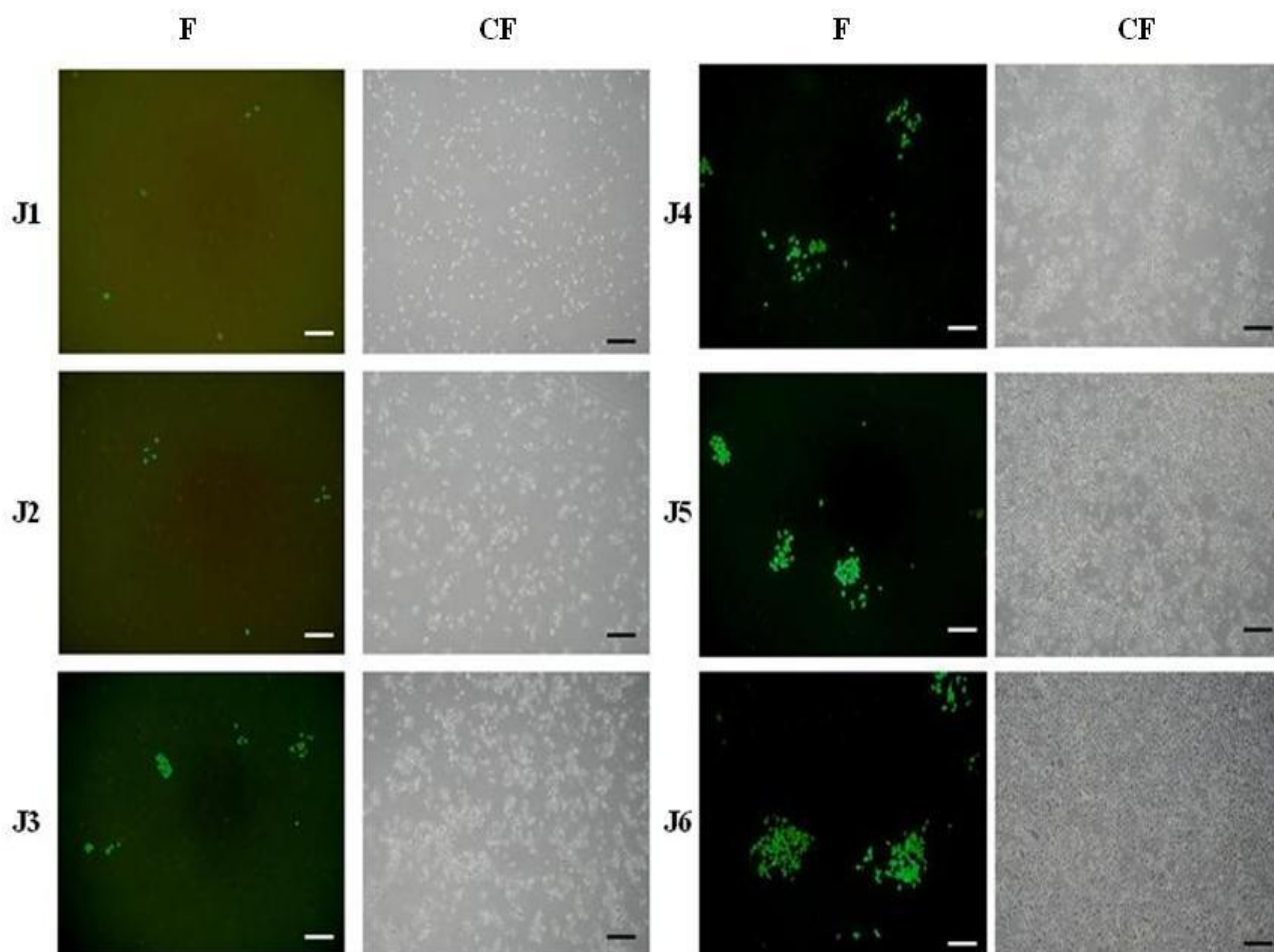
L'analyse de l'expression de l'ARN messager par qRT-PCR a montré que la podoplanine est exprimée dans les cellules et qu'il y a une tendance à la diminution de l'expression avec la confluence (*figure 1.6A*). Cependant, cette diminution est statistiquement non significative.

Par la suite, nous avons étudié l'abondance protéique par Western blot. Cette analyse ne montre pas de variation notable de l'expression de la podoplanine en fonction des stades de confluence, contrairement aux résultats obtenus pour l'expression de l'ARN messager (*figure 1.6B*). Ces divergences peuvent s'expliquer du fait d'une grande variabilité entre les cultures successives. En effet, il était difficile de cultiver les cellules A431 dans le milieu Epilife complet. La raison de cette difficulté de culture est due au changement brutal du milieu de culture. En effet lors de l'ensemencement des cellules, celles-ci sont d'abord cultivées dans le milieu DMEM complet qui est par la suite remplacé par le milieu Epilife complet.

Pour terminer, un immunomarquage a été effectué sur les cellules sous-confluentes (SC), confluentes (C) et post-confluentes (PC). Ce marquage montre également une localisation péricellulaire du signal, dont l'intensité ne semble pas varier en fonction du stade de confluence. Cependant, contrairement aux cellules cultivées dans du milieu DMEM complet, le marquage paraît plus hétérogène dans ce cas-ci. En effet, certaines cellules expriment la podoplanine alors que d'autres ne l'expriment pas (*figure 1.6C*).

Bien que la podoplanine soit exprimée dans les cellules A431 cultivées dans les deux types de milieux, il semblerait que le choix du milieu influence la modulation de cette expression avec le degré de confluence. En effet, si l'on compare premièrement les résultats de l'expression de l'ARN messager, on peut voir une tendance à la diminution de l'expression avec la confluence pour les cellules cultivées en milieu Epilife, alors que cette diminution n'est pas observée dans les cellules cultivées dans le milieu DMEM. On observe également que l'abondance protéique semble augmenter avec la confluence pour les cellules cultivées dans le milieu DMEM, alors qu'il n'y a pas de variation lorsque les cellules sont cultivées dans le milieu Epilife. Enfin, l'immunomarquage nous montre un signal plus hétérogène dans les cellules cultivées en milieu Epilife complet. Ces différences pourraient s'expliquer par la





**Figure 2.1 : Coculture de kératinocytes normaux et cancéreux en monocouche.** Des kératinocytes normaux et des cellules A431 exprimant la GFP ont étéensemencés ensemble dans du milieu Epilife complet. Les densités choisies étaient de 8000 cellules/cm<sup>2</sup> pour les kératinocytes normaux et de 50 cellules/cm<sup>2</sup> pour les cellules A431 (soit un ratio cellules A431/kératinocytes normaux de 1/160). L'observation des cultures a été réalisée au microscope à contraste de phase (**CF**) et les cellules A431 ont été observées au microscope à fluorescence (**F**). J1 = 1<sup>er</sup> jour après l'ensemencement. Barres d'échelle = 200 µm

composition des deux types de milieux de culture. En effet, le milieu DMEM complet est un milieu contenant du sérum et une concentration élevée en ions calciques (1,8 mM) tandis que le milieu Epilife complet ne contient pas de sérum et possède une faible concentration en ions calciques (0,06 mM).

## **2 Elaboration d'un modèle de carcinome spinocellulaire dans un environnement épidermique**

L'objectif de ce mémoire est d'élaborer un modèle de carcinome spinocellulaire dans un environnement épidermique qui nous permettra d'étudier le comportement des cellules cancéreuses et le rôle de la podoplanine dans ce comportement.

### **2.1 Description du modèle**

Le modèle se base sur l'élaboration de cocultures de kératinocytes normaux et de cellules cancéreuses. Pour discriminer les deux populations cellulaires, les cellules A431 ont été rendues constitutivement fluorescentes grâce à une infection avec des particules lentivirales contenant le gène de la GFP.

Pour élaborer le modèle de carcinome spinocellulaire, deux types de cocultures ont été réalisés : le modèle en monocouche et le modèle en épiderme reconstruit.

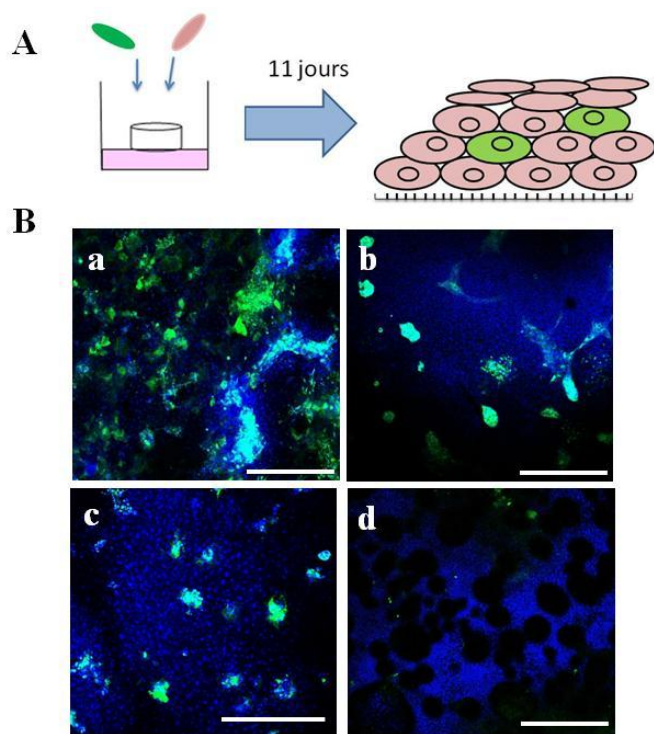
#### *2.1.1 Modèle de coculture en monocouche*

Afin de réaliser le modèle de coculture en monocouche, les kératinocytes normaux et les cellules A431 ont étéensemencés ensemble dans des boîtes de cultures de 9.6 cm<sup>2</sup> dans du milieu Epilife complet. Les kératinocytes normaux ont étéensemencés à une densité de 8000 cellules/cm<sup>2</sup>. Concernant les cellules A431, différents ratios ont été testés afin de choisir la densité relative de cellules A431 optimale permettant d'obtenir suffisamment de cellules A431 pour pouvoir les observer rapidement, mais pour qu'elles soient aussi suffisamment dispersées pour pouvoir visualiser les colonies indépendamment l'une de l'autre. Les ratios utilisés étaient de 1/800 ; 1/160 ; 1/80 ; 1/16 et 1/8 cellules A431/kératinocytes normaux correspondant respectivement à des densités cellulaires de 10, 50, 100, 500 et 1000 cellules/cm<sup>2</sup>. Les premières cocultures obtenues nous ont permis de déterminer que le ratio 1/160 permettait la meilleure visualisation des cellules. C'est donc ce ratio qui a été utilisé pour les expériences suivantes.

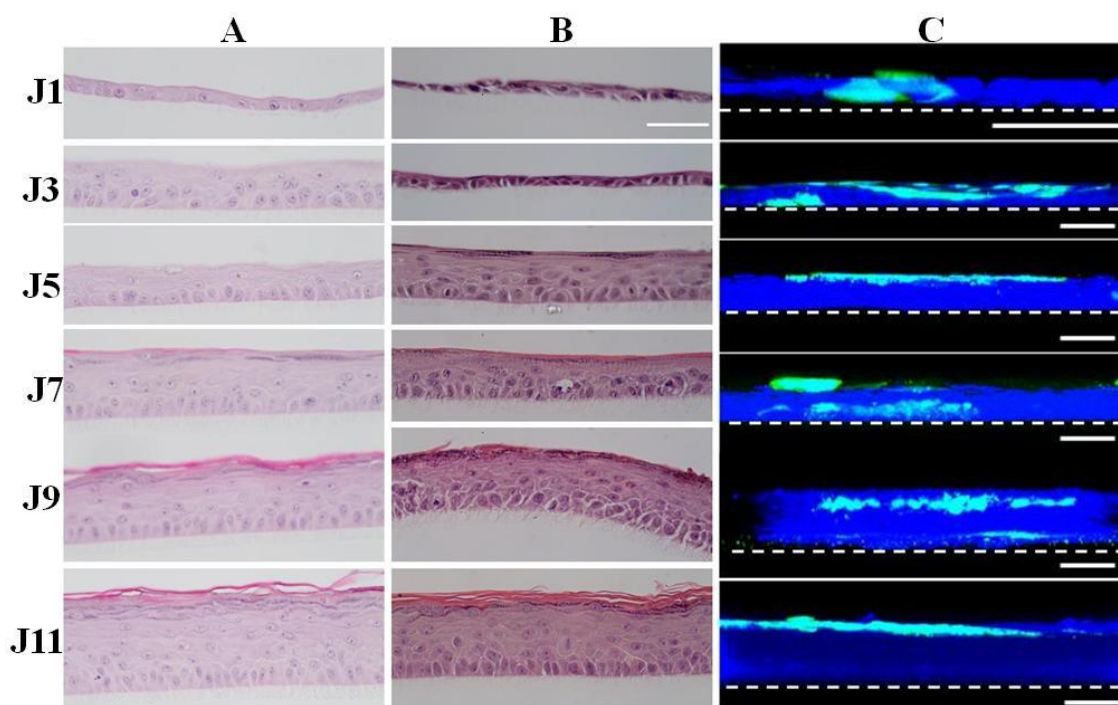
Des cocultures ont donc été cultivées jusqu'au stade de confluence, et le phénotype cellulaire a été analysé du point de vue de sa croissance et de sa morphologie. Les résultats obtenus nous permettent d'observer que les kératinocytes normaux supportent la présence des cellules A431 et vice-versa, et prolifèrent de manière normale (*figure 2.1*). Concernant les cellules A431, celles-ci forment au fur et à mesure des colonies qui grandissent. Lorsque l'on observe toutes les cellules au microscope à contraste de phase, on peut également observer qu'il est impossible de distinguer les deux types cellulaires et que leur association n'affecte pas la morphologie des cellules. C'est donc la visualisation, par microscopie à fluorescence, de la GFP exprimée par les cellules A431 qui permet de discerner ces cellules.

Le modèle en monocouche présente l'avantage de permettre une visualisation directe par microscopie du comportement des cellules en termes d'organisation, de croissance et





**Figure 2.2 : Elaboration d'un modèle de tumeurs épidermiques dans un épiderme reconstruit *in vitro*.** (A) des kératinocytes normaux et des cellules A431 GFP + ont été ensemencés sur des filtres de polycarbonate. Après 11 jours de culture, on obtient un tissu reconstruit. (B) Les épidermes ont été cultivés jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour de reconstruction, fixés dans de la PFA 4% et les noyaux ont été marqués avec le To-pro. La visualisation du plan z a été effectuée par microscopie confocale. (a) ratio 1/10, (b) ratio 1/50, (c) ratio 1/100, (d) ratio 1/500. Barres d'échelle = 500 µm



**Figure 2.3 : Caractérisation du modèle de tumeurs épidermiques dans un épiderme reconstruit.** Des kératinocytes normaux ont été ensemencés seuls (A) ou avec des cellules A431 (ratio de cellules A431/kératinocytes normaux = 1/100) (B et C) sur des filtres de polycarbonate, puis cultivés durant différentes périodes (J1 = 1<sup>er</sup> jour après l'ensemencement). (A et B) Les coupes d'épidermes ont été colorées à l'hémalaun et à l'éosine. (C) Les épidermes constitués de kératinocytes normaux et des cellules A431 ont été fixés dans de la PFA à 4% puis les noyaux ont été marqués avec le To-pro (en bleu). Les épidermes ont ensuite été observés au microscope confocal et une reconstruction 3D a été réalisée pour visualiser les cellules A431 (en vert) dans le tissu. Barres d'échelle = 50 µm

d'invasivité. Ce modèle permettra, en outre, d'analyser la proportion de cellules A431 parmi les kératinocytes normaux par l'utilisation du BD pathway, un cytomètre basé sur une approche microscopique.

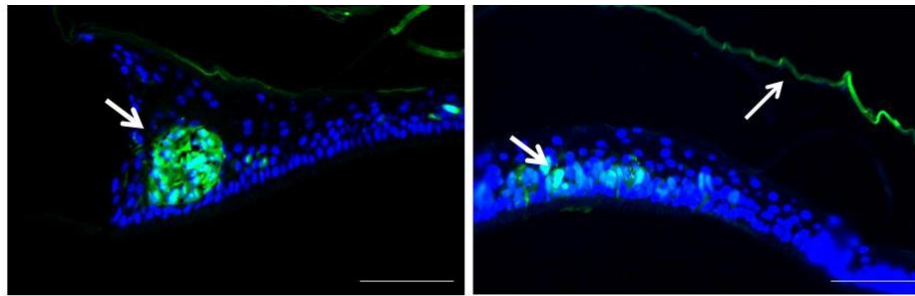
### 2.1.2 *Modèle de coculture en épiderme reconstruit*

Le principal avantage de la coculture en monocouche est la visualisation directe des cellules vivantes. Cependant, ce premier modèle présente un inconvénient important, qui est son éloignement par rapport à la situation rencontrée *in vivo*. C'est pourquoi un second modèle a été créé. Il s'agit d'un modèle d'épiderme reconstruit en 3 dimensions contenant des cellules A431 que nous avons appelé : « Modèle de tumeurs épidermiques dans un épiderme reconstruit ».

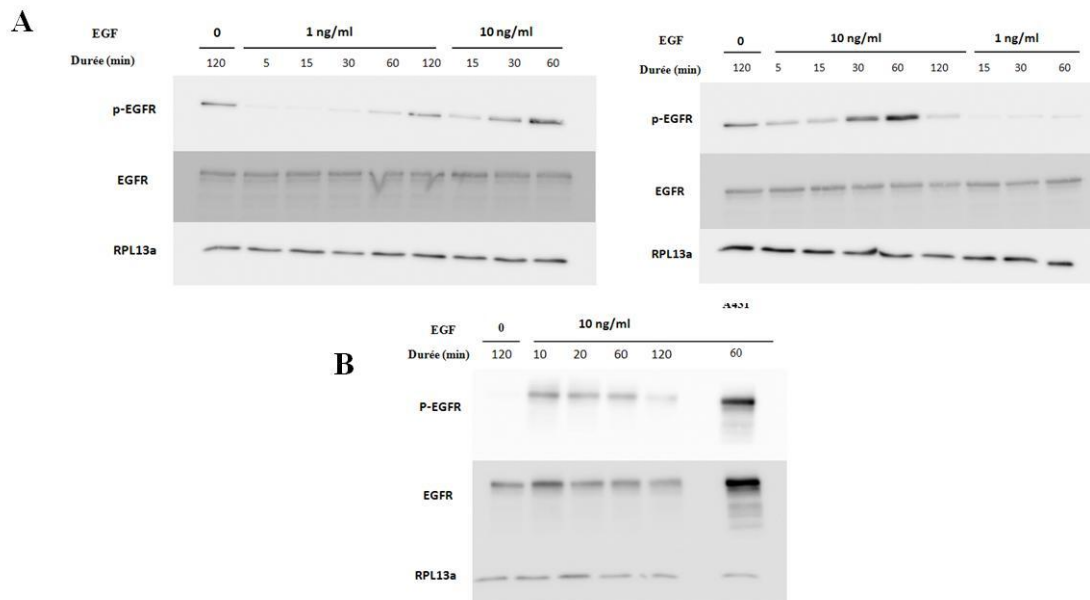
Pour obtenir ce modèle, les kératinocytes normaux et les cellules A431 GFP-positives sont ensemencés ensemble sur des filtres de polycarbonate. L'interface air liquide est réalisée 24 heures après pour permettre la formation de la barrière et la stratification du tissu. Ces cellules sont cultivées dans un milieu spécifique à la culture des épidermes reconstruits, permettant la croissance, la différenciation et la stratification. Comme pour le modèle de coculture en monocouche, nous avons testé différents ratios cellules A431/kératinocytes normaux : 1/10 ; 1/50 ; 1/100 et 1/500. Les épidermes ont été cultivés jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour de reconstruction puis ont été fixés. Les noyaux ont ensuite été marqués pour permettre la visualisation du tissu entier par microscopie confocale (*figure 2.2*). Les résultats nous ont permis d'observer, une croissance des cellules cancéreuses ainsi que des kératinocytes normaux. Deuxièmement, nous avons pu observer que les cellules A431 formaient de petites colonies. Le ratio permettant la meilleure visualisation de ces colonies est celui de 1/100. En effet, les ratios 1/10 et 1/50 présentent une densité trop importante et les cellules sont alors retrouvées dans tout le tissu, tandis que dans le ratio 1/500 la densité de cellules A431 GFP-positives est trop faible et il est difficile de trouver des cellules A431 dans la masse du tissu. Pour les expériences suivantes, c'est donc le ratio de cellules A431/kératinocytes normaux de 1/100 qui a été choisi.

De manière à analyser et caractériser la reconstruction de ces épidermes, de nouvelles cocultures en 3 dimensions ont été réalisées et interrompues à différents stades de reconstruction à partir du 1<sup>er</sup> jour après l'ensemencement jusqu'au 11<sup>ème</sup> jour. Une comparaison de la morphologie de ces épidermes (*figure 2.3B*) a été réalisée avec des épidermes reconstruits constitués uniquement de kératinocytes normaux (*figure 2.3A*), ce qui a permis d'observer que les deux types d'épidermes présentaient une reconstruction similaire. Ces résultats valident les mises au point du modèle.

Ensuite, nous avons analysé les épidermes aux différents stades de reconstruction au microscope confocal pour parfaire la caractérisation du modèle. Chaque épiderme a été analysé au microscope, et une reconstruction 3D a été réalisée (*figure 2.3C*). Les résultats obtenus nous permettent de visualiser la localisation des cellules A431. Ces cellules sont généralement situées en surface du tissu, quel que soit le stade de reconstruction. Cependant, il est possible d'observer également quelques cellules A431 dans les couches plus profondes du tissu. Cette localisation majoritaire à la surface du tissu pourrait s'expliquer du fait de la différence d'adhérence entre les kératinocytes normaux et les cellules A431 pour le support de culture. En effet, nous avons observé que les kératinocytes normaux sont beaucoup plus adhérents à la surface de culture que les cellules A431. En effet, lors de la trypsinisation, on peut constater que les cellules A431 se détachent beaucoup plus rapidement que les kératinocytes normaux. L'explication possible est que le profil d'expression des protéines



**Figure 2.4 : Visualisation des colonies de cellules A431 GFP + au sein de l'épiderme reconstruit.** Les épidermes reconstruits constitués de kératinocytes normaux et de cellules A431 GFP + cultivés jusqu'au 11<sup>ème</sup> jour de reconstruction ont été fixés dans de la PFA 4% et enrobés en paraffine. Les noyaux ont ensuite été marqués avec du Hoechst (en bleu). La localisation des cellules A431 (en vert) est représentée par les flèches. Barres d'échelle = 100  $\mu$ m



**Figure 2.5 : Etude de l'activation du récepteur de l'EGF (EGFR) après une incubation avec de l'EGF de cellules A431 et de kératinocytes normaux.** Les cellules A431 (A) et les kératinocytes normaux (B) ont été cultivés jusqu'à confluence puis ont été incubés avec de l'EGF à une concentration de 1 ng/ml ou de 10 ng/ml pendant différentes périodes de temps (de 5 minutes à 120 minutes). Les protéines ont ensuite été extraites et l'abondance protéique du récepteur de l'EGF (EGFR) ainsi que du récepteur phosphorylé (p-EGFR) a été analysée par Western blot. RPL13a a été utilisé comme marqueur de charge. (A) Résultats pour les cellules A431 (B) Résultats pour les kératinocytes normaux.

impliquées dans l'adhérence comme les intégrines soit différent en fonction du type cellulaire, rendant les cellules A431 moins adhérentes si leur expression est plus faible.

Pour la caractérisation du modèle, nous avons observé des coupes du modèle en paraffine afin d'utiliser un autre mode de visualisation pour observer la localisation des cellules A431 GFP-positives (*figure 2.4*). Les résultats nous montrent que les cellules A431 peuvent être présentes à la surface du tissu ou dans les couches plus basales du tissu, ce qui confirme les résultats obtenus en microscopie confocale. De plus, les cellules A431 peuvent être dispersées dans le tissu ou former des colonies.

En conclusion, nous avons pu établir un second modèle de coculture, celui-ci étant en 3 dimensions et s'approchant donc de la condition retrouvée *in vivo*. Ce modèle peut être visualisé par deux techniques qui nous permettent d'observer la localisation et la croissance des cellules A431 dans le tissu. Grâce à ce second modèle, nous pourrions étudier le comportement des cellules A431 dans un environnement tissulaire épidermique.

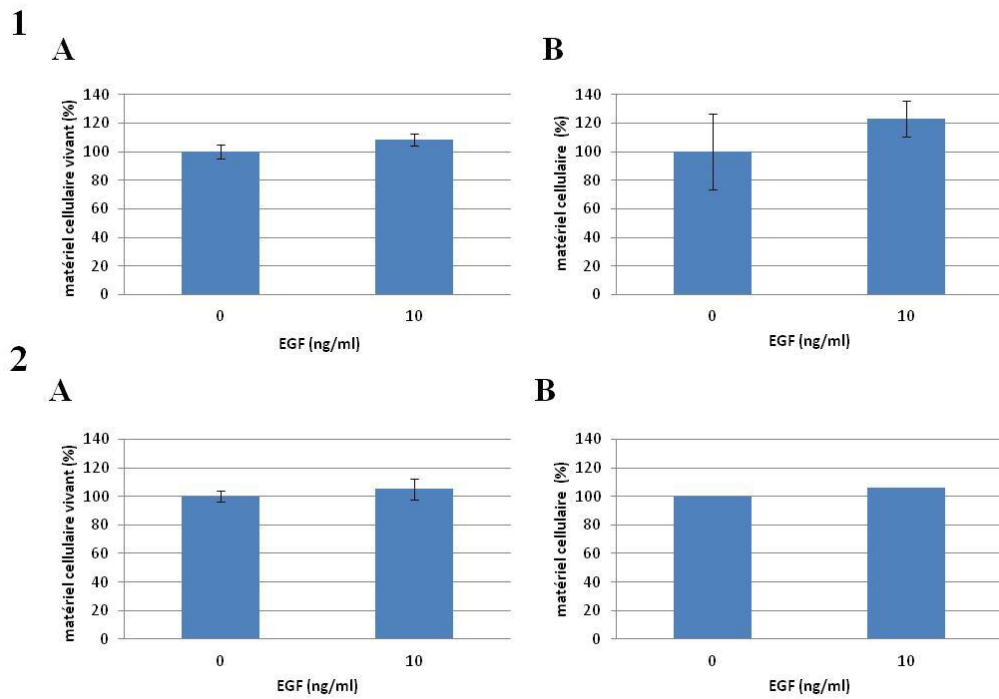
## 2.2 Mise au point du modèle de coculture

Nous avons donc pu obtenir deux modèles de coculture qui seront utilisés notamment pour étudier le rôle de la podoplanine dans les kératinocytes cancéreux, objectif final de ce travail. Cependant, avant de réaliser cette étude, il semble nécessaire d'analyser les potentialités du modèle, et, en particulier, d'investiguer les possibilités de modulation du phénotype des cellules par des facteurs environnementaux. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps, tenté de déterminer une condition permettant de moduler la croissance des cellules cancéreuses sans affecter le comportement des cellules normales. Comme décrit précédemment, les cellules A431 prolifèrent de manière très rapide et surexpriment notamment le récepteur de l'EGF. Etant donné que cette caractéristique pourrait entraîner une sensibilité accrue des cellules A431 à l'EGF, nous avons décidé d'évaluer l'influence de ce facteur sur la population cellulaire.

### 2.2.1 Etude de l'influence de l'EGF sur la population cellulaire

Une étape préliminaire consiste à s'assurer que les cellules répondent à la présence de l'EGF. Pour ce faire, nous avons analysé l'effet de l'ajout d'EGF exogène sur la phosphorylation du récepteur de l'EGF. Les cellules normales et cancéreuses ont été cultivées jusqu'à la confluence puis ont été incubées dans du milieu sans sérum pendant 2 heures pour éliminer toute trace d'EGF présent dans le milieu de culture. Ensuite, le milieu a été remplacé par du milieu contenant de l'EGF à une concentration de 0, 1 ou 10 ng/ml, et les cellules ont été incubées pendant différentes périodes de temps allant de 5 minutes à 120 minutes. Pour la culture contrôle (milieu sans EGF), seule l'incubation de 120 minutes a été réalisée. La phosphorylation du récepteur a ensuite été analysée par Western blot (*figure 2.5*).

Concernant les cellules A431 (*figure 2.5A*), les résultats nous montrent premièrement qu'il y a une autophosphorylation du récepteur de l'EGF sans ajout d'EGF exogène. Deuxièmement, nous pouvons observer que l'EGF à une concentration de 1 ng/ml n'induit pas d'augmentation de phosphorylation du récepteur. En revanche, lorsque les cellules A431 sont incubées avec 10 ng/ml d'EGF, une augmentation de cette phosphorylation est détectable après 30 minutes d'incubation et encore plus évidente après 60 minutes. Cette première expérience nous permet de démontrer que l'ajout d'EGF à une concentration de 10 ng/ml sur des cellules A431 induit bien une phosphorylation du récepteur de l'EGF. C'est donc la concentration d'EGF de 10 ng/ml qui a été choisie pour les expériences futures. Quant aux kératinocytes normaux (*figure 2.5B*), une incubation de 10 minutes avec 10 ng/ml d'EGF induit la phosphorylation du



**Figure 2.6 : Analyse de l'influence de l'EGF sur la population cellulaire de kératinocytes normaux et de cellules A431.** Des kératinocytes normaux confluents (**1**) et des cellules A431 sous-confluents (**2**) ont été incubés avec de l'EGF à 10 ng/ml pendant 24 heures. Un test MTT (**A**) ainsi qu'un comptage des cellules (**B**) ont été effectués. Les barres d'erreur représentent les écart-types sur la moyenne de répétitions non indépendantes (N=1).

récepteur de l'EGF. Cette induction est maintenue après 20 et 60 minutes, mais tend à diminuer après 120 minutes. On peut également observer que les cellules A431 surexpriment le récepteur de l'EGF, confirmant ce qui a été décrit précédemment.

Cette première expérience nous a permis de démontrer que l'EGF est actif et induit une phosphorylation du récepteur à la fois dans des cellules A431 et dans des kératinocytes normaux. La seconde étape est d'analyser l'impact de cet ajout d'EGF sur les populations cellulaires. Pour ce faire, des kératinocytes normaux et cancéreux sous-confluentes ou confluentes ont été incubés pendant 2 heures dans du milieu sans sérum, puis traités ou non pendant 24 heures avec de l'EGF à une concentration de 10 ng/ml. Après ces 24 heures de traitement, un test MTT ainsi qu'un comptage des cellules ont été effectués. Les résultats montrent que l'EGF n'induit pas de modification de la population cellulaire des kératinocytes normaux (*figure 2.6.1*), ni de celle des kératinocytes cancéreux (*figure 2.6.2*). En effet, les résultats, à la fois du test MTT et du comptage ne montrent pas de changement dans la taille de la population cellulaire.

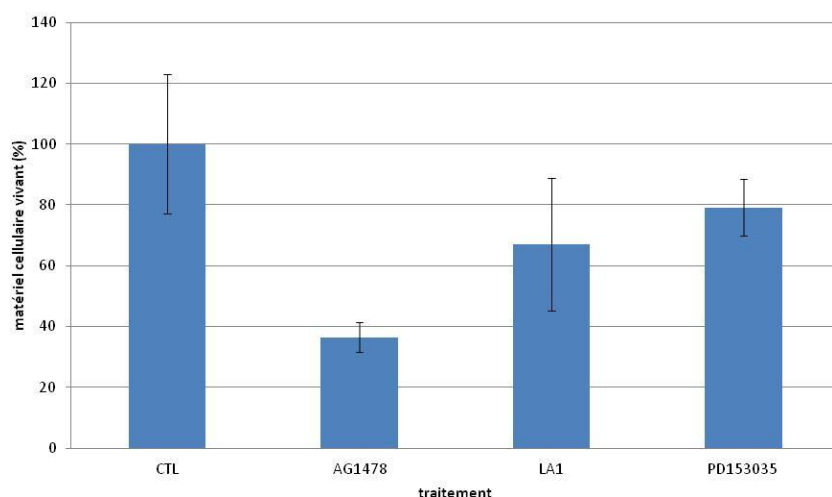
Les résultats attendus ne sont pas ceux espérés, car nous nous attendions à voir une influence positive de l'EGF sur la taille de la population des cellules A431, puisqu'elles surexpriment le récepteur de l'EGF et devraient donc être particulièrement sensibles à ce facteur. Une explication possible à ce résultat réside dans le taux de prolifération naturellement très important des cellules A431, qui serait donc particulièrement difficile à augmenter. De plus, comme nous l'avons vu, les cellules A431 présentent une autophosphorylation de leur récepteur de l'EGF, elles n'ont donc peut-être pas besoin d'ajout d'EGF exogène pour produire une croissance optimale.

Concernant les kératinocytes normaux, l'absence d'effet de l'ajout d'EGF sur la taille de la population cellulaire s'explique par le fait que les cellules ont été incubées lorsqu'elles étaient au stade de confluence. En effet, à cette densité, les kératinocytes normaux commencent leur processus de différenciation, au détriment de leur prolifération. Ce stade avait été choisi car il correspond à l'état de proximité cellulaire dans les modèles de coculture.

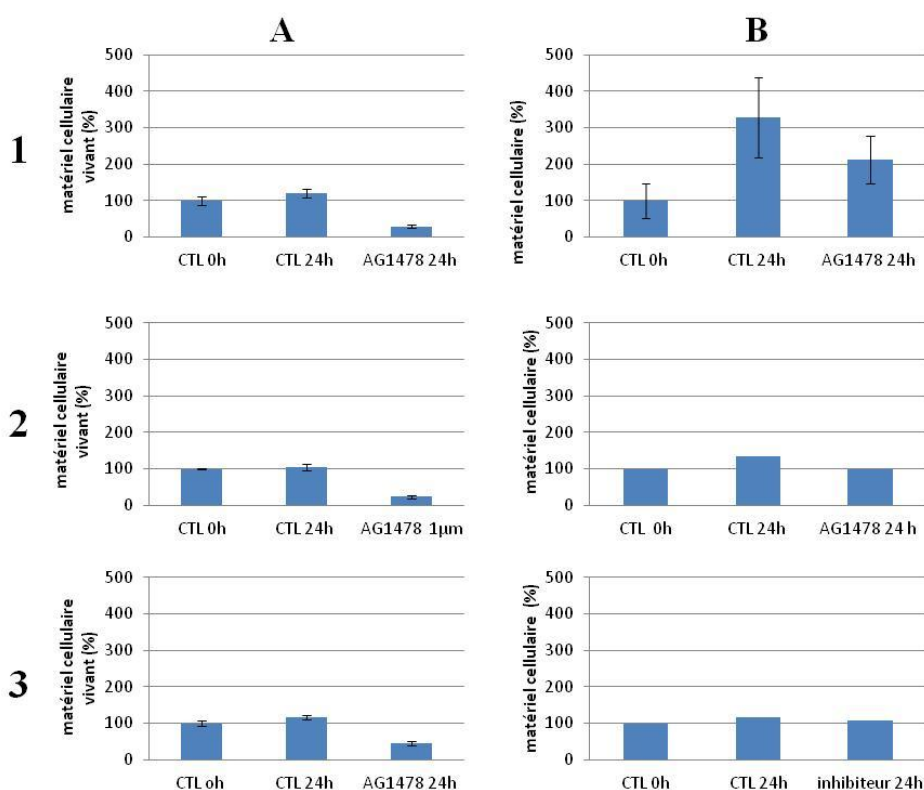
### *2.2.2 Etude de l'influence d'inhibiteurs du récepteur de l'EGF sur la population cellulaire*

Nous avons donc observé que l'EGF n'induisait pas de modification de la population des cellules A431. Il a donc fallu trouver une autre approche pour nous permettre de tester si nous pouvons influencer la taille de la population cellulaire. Etant donné que la surexpression du récepteur de l'EGF par les cellules A431 est potentiellement impliquée dans leur survie et leur prolifération, nous avons décidé d'agir sur ce récepteur en bloquant son activité et d'analyser l'effet de cette inhibition sur la taille de la population cellulaire. Trois inhibiteurs ont été testés : AG1478, PD153035 et LA1. Les inhibiteurs AG1478 et PD153035 agissent au niveau du domaine tyrosine kinase du récepteur en inhibant son activité et sa phosphorylation, tandis que le LA1 est un anticorps neutralisant la liaison à un ligand, en interagissant avec le domaine extracellulaire du récepteur.

Dans une première expérience, nous avons testé l'effet des trois inhibiteurs sur les cellules A431 afin de déterminer celui qui influence de manière la plus conséquente la taille de la population cellulaire. Les cellules A431 sous-confluentes ont donc été incubées, comme lors des précédentes expériences, dans du milieu sans sérum pendant 2 heures puis ont été traitées avec les inhibiteurs du récepteur de l'EGF. Après un traitement de 24 heures, un test MTT a été réalisé dans le but d'analyser si l'ajout d'inhibiteur influence la quantité de matériel cellulaire vivant. Les résultats ont permis de montrer que l'inhibiteur AG1478 induit une



**Figure 2.7 : Analyse de l'influence d'inhibiteurs du récepteur de l'EGF sur la taille de la population des cellules A431.** Des cellules A431 sous-confluentes ont été incubées durant 2 heures dans du milieu sans sérum puis ont été traitées avec des inhibiteurs du récepteur de l'EGF pendant 24 heures (AG178 1 $\mu$ m; LA1 10  $\mu$ g/ml et PD153035 500 nM). Un test MTT a ensuite été réalisé. Les barres d'erreur représentent les écart-types sur la moyenne de répétitions non indépendantes (N=1).



**Figure 2.8 : Influence de l'inhibiteur AG1478 sur la population cellulaire des cellules A431 et des kératinocytes normaux.** Des cellules A431 sous-confluentes (1), confluentes (2) et des kératinocytes normaux confluentes (3) ont été traitées avec l'inhibiteur AG1478 (1 $\mu$ M) pendant 24 heures. Un test MTT (A) ainsi qu'un comptage cellulaire (B) ont ensuite été réalisés. Les barres d'erreur représentent les écart-types sur la moyenne de répétitions non indépendantes (N=1).



perturbation dans la population cellulaire importante lorsque l'on compare les résultats à la condition contrôle sans inhibiteur (*figure 2.7*). Nous avons alors choisi cet inhibiteur pour les expériences suivantes.

Par la suite, et ce pour confirmer l'effet de l'inhibiteur AG1478, nous avons réalisé de nouveau des cultures de cellules A431 à la fois sous-confluentes (*figure 2.8.1*) et confluentes (*figure 2.8.2*) que nous avons traitées pendant 24 heures avec l'inhibiteur. Nous avons réalisé deux contrôles de cultures non traitées : l'une arrêtée juste au début de l'expérience (contrôle 0h) et l'autre en fin d'expérience (contrôle 24 h). Un test MTT ainsi qu'un comptage des cellules ont été réalisés. Les résultats du test MTT nous montrent que l'inhibiteur a bien un effet sur la population cellulaire mais qui semble, en réalité, plutôt cytotoxique sur les cellules, puisqu'il y a une nette diminution de la taille de la population cellulaire par rapport au contrôle 0h (*figure 2.8.A*). Cependant, le comptage des cellules, quant à lui, ne révèle pas cet effet cytotoxique, mais présente plutôt un effet cytotatique (*figure 2.8B*).

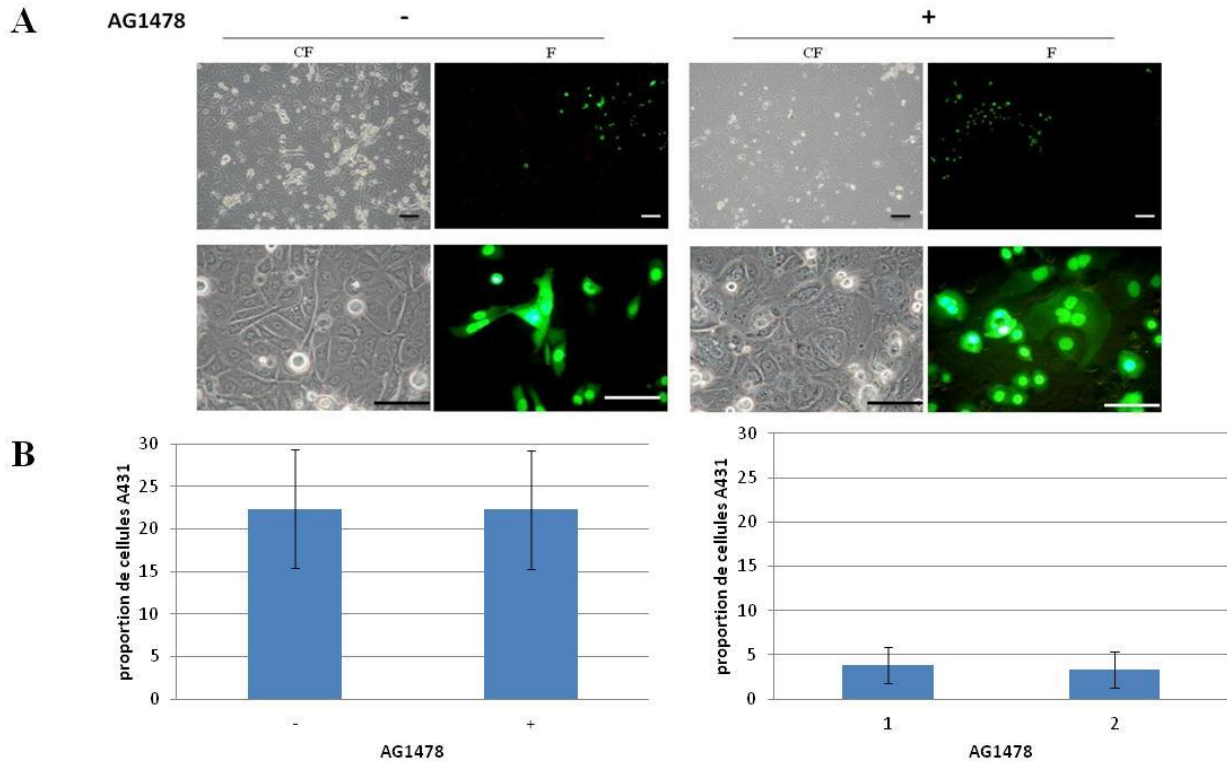
Nous avons ensuite analysé l'effet de cet inhibiteur sur les kératinocytes normaux pour déterminer si son effet est spécifique des cellules A431. Pour cela, la même expérience a été réalisée sur les kératinocytes normaux à confluence. Comme pour les cellules A431, les résultats du test MTT montrent un effet cytotoxique. Cependant, l'effet cytotoxique semble légèrement moindre que pour les cellules A431, peut-être du fait de la surexpression du récepteur de l'EGF par ces dernières. Aucun effet n'est observable par comptage cellulaire puisque les cellules confluentes ne prolifèrent pratiquement plus (*Figure 2.8.3 A et B*).

En conclusion, l'inhibition du récepteur de l'EGF ne semble pas une méthode de choix pour agir sur la taille de la population des cellules A431 sans affecter celle des kératinocytes normaux. Cependant, afin d'écarter définitivement cette idée, cette même expérience a été réalisée sur des cocultures en monocouche. Les cellules A431 et les kératinocytes normaux ont étéensemencés selon un ratio de 1/160 ou de 1/50. Les cocultures ont été cultivées jusqu'à confluence puis ont été incubées pendant 2 heures dans du milieu sans sérum, puis enfin traitées pendant 24 heures avec l'inhibiteur AG1478. L'observation des cellules à la fin du traitement ne montre pas de différence entre les conditions contrôle et traitée. Néanmoins, il semblerait que les cellules soient en souffrance lorsqu'elles sont en présence de l'inhibiteur (*figure 2.9A*). Les cocultures ont ensuite été fixées dans de la PFA 4% et un anticorps anti-turboGFP a été utilisé afin d'utiliser la technique du BD pathway pour déterminer la proportion de cellules A431 par rapport aux kératinocytes normaux.

La technique du BD pathway permet de déterminer pour chaque cellule une intensité de fluorescence. Un seuil est ensuite déterminé à partir duquel les cellules sont considérées positives. La proportion de cellules dont l'intensité fluorescente est supérieure au seuil déterminé est alors calculée. Les résultats obtenus nous montrent qu'il n'y a pas de différence entre les conditions traitées avec l'inhibiteur AG1478 et non traitées, quel que soit le rapport cellulaire (*figure 2.9B*). Le traitement ne permet donc pas de moduler la proportion de cellules A431 dans la coculture. Notons cependant que cette technique d'analyse présente une limitation importante : lors de l'élaboration des cocultures dans les plaques 12 puits, l'ensemencement n'est pas suffisamment homogène et le BD pathway ne permet d'analyser que certaines zones de la culture, ce qui risque de ne pas être représentatif de la population totale. Il faudrait donc compléter la technique du BD pathway par une autre technique comme, par exemple, une analyse de chaque cellule par cytométrie de flux. Il est à noter également, que lorsque les cellules sont confluentes, leur grand nombre ne facilite pas l'étude au BD pathway puisqu'il est plus difficile de délimiter chaque cellule de manière précise et de calculer l'intensité pour chaque cellule.







**Figure 2.9 : Influence de l'inhibiteur AG1478 sur la coculture en monocouche de kératinocytes normaux et de cellules A431.** Les cocultures ont été traitées à confluence avec l'inhibiteur AG1478 (1μm) pendant 24h. **(A)** les cultures ont été observées au microscope à contraste de phase (CF) et les cellules A431 au microscope à fluorescence (F). Barres d'échelle = 50 μm. **(B)** Les cocultures ont été fixées dans de la PFA 4% puis marquées par un anti-turbo GFP. Les cocultures ont ensuite été analysées par la technique du BD pathway et une proportion de cellules A431 a été calculée. Les barres d'erreur représentent les écart-types sur la moyenne de répétitions non indépendantes (N=1).



# **Discussion et perspectives**



# 1 Caractérisation de l'expression de la podoplanine dans les kératinocytes normaux et cancéreux

La podoplanine est une protéine transmembranaire présente dans de nombreux tissus. Cette protéine serait impliquée dans le développement de différentes structures et organes comme les vaisseaux lymphatiques et le cœur (Schacht, Ramirez et al. 2003; Mahtab, Wijffels et al. 2008; Raica, Cimpean et al. 2008; Mahtab, Vicente-Steijn et al. 2009; Astarita, Acton et al. 2012). La podoplanine est également exprimée dans de nombreux cancers et particulièrement dans le carcinome spinocellulaire (Schacht, Dadras et al. 2005; Martin-Villar, Megias et al. 2006; Wicki, Lehembre et al. 2006). Il semblerait qu'elle soit impliquée dans la tumorigenèse via différents mécanismes, dont l'agrégation plaquettaire, l'induction de la migration cellulaire et l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (Astarita, Acton et al. 2012). Cependant, les mécanismes précis par lesquels la podoplanine intervient lors de la tumorigenèse ne sont pas encore clairement connus. C'est pourquoi ce travail avait pour objectif l'élaboration d'un modèle de carcinome spinocellulaire au sein d'un environnement épidermique *in vitro* afin d'y étudier le rôle de la podoplanine.

Avant d'élaborer le modèle nous avons caractérisé l'expression de la podoplanine dans les deux populations cellulaires qui le constituent : les kératinocytes normaux et les kératinocytes cancéreux de la lignée A431. Les résultats nous ont permis de démontrer que les kératinocytes normaux ont la capacité d'exprimer la podoplanine et que le niveau d'expression est en relation inverse avec la densité cellulaire. En effet, l'expression de la podoplanine diminue avec la confluence.

Sur base de ces premiers résultats, différentes hypothèses quant au rôle de la podoplanine dans les kératinocytes normaux peuvent être proposées : premièrement, elle pourrait être impliquée dans la prolifération cellulaire. En effet, tout comme l'expression de la podoplanine, le taux de prolifération des kératinocytes diminue avec la densité cellulaire. Une seconde hypothèse est l'implication de la podoplanine dans la migration cellulaire, phénomène également plus fréquent pour les cellules sous-confluentes, qui ont tendance à se rapprocher les unes des autres et à recouvrir toute la surface de culture.

Nous avons ensuite caractérisé l'expression et la localisation de la podoplanine dans des épidermes reconstruits *in vitro* et avons détecté à notre surprise par immunomarquage, un signal au niveau de la couche basale semblant augmenter avec le degré de reconstruction. Cependant, ce constat n'a pas pu être confirmé par des méthodes quantitatives telles que la qRT-PCR ou le Western blot car ces techniques n'offrent pas la possibilité de distinguer les différentes couches du tissu. L'analyse par Western blot a cependant permis de détecter une différence dans le poids moléculaire de la podoplanine entre des cultures en monocouche et des cultures d'épidermes reconstruits, pouvant être expliquée par exemple par une modification de l'état de glycosylation de la protéine.

Dans le cas des épidermes reconstruits, l'hypothèse de l'implication de la podoplanine dans la prolifération cellulaire ne peut être maintenue, car il a été démontré que la prolifération des cellules dans les épidermes reconstruits est plus importante lors des premiers jours de reconstruction, alors que la podoplanine semble davantage exprimée dans les étapes plus tardives (Frankart, Malaisse et al. 2012).



Il est intéressant de noter que l'on retrouve une expression de la podoplanine dans un tissu reconstruit *in vitro* alors que celle-ci n'est pas présente *in vivo* dans un épiderme interfolliculaire humain normal. Cette différence pourrait s'expliquer par les conditions de culture. En effet, la composition des milieux de culture utilisés pourraient influencer l'expression de la podoplanine. Ces milieux contiennent des facteurs de croissance comme l'EGF, mais également de l'hydrocortisone, une substance anti-inflammatoire. Ces deux facteurs étant capables de moduler l'expression de nombreux gènes (Tomic-Canic, Komine et al. 1998; Stellato 2007; Le, Takai et al. 2009; Blumenberg 2013), il serait intéressant de tester leur influence sur l'expression de la podoplanine dans des épidermes reconstruits.

Nous avons ensuite caractérisé l'expression de la podoplanine dans les cellules A431 cultivées dans du milieu DMEM complet et nous avons observé que l'expression de l'ARN messenger ne varie pas en fonction de la densité cellulaire, tandis que l'abondance protéique tend à augmenter au stade de confluence. Cette différence peut être due à l'accumulation des protéines, si ces dernières sont plus stables que l'ARN messenger correspondant.

L'augmentation de l'abondance protéique à confluence confirme des résultats, observés sur le même type cellulaire, publiés dans la littérature (Fujii, Honma et al. 2013).

Du point de vue de la localisation, la protéine semble majoritairement située au niveau péricellulaire, ce qui concorde avec le fait qu'il s'agit d'une protéine transmembranaire. Cependant, il semblerait également que la podoplanine soit localisée au niveau cytoplasmique, correspondant probablement à une localisation transmembranaire de la podoplanine au sein de l'appareil cyto-membranaire.

Nous avons ensuite analysé le niveau d'expression de la podoplanine dans des cellules A431 cultivées dans du milieu Epilife complet, milieu prévu pour les cocultures. Les résultats obtenus nous montrent des profils différents de ceux décrits lors de l'utilisation du milieu DMEM. En effet, concernant l'expression de l'ARN messenger, nous avons observé une tendance à la diminution de l'expression avec la confluence, alors qu'aucune variation de l'abondance protéique n'a pu être observée.

Plusieurs raisons peuvent expliquer ces divergences. La première est que la composition des milieux est différente. En effet, le milieu DMEM contient 10 % de sérum et une forte concentration d'ions calcium (1.8 mM), tandis que le milieu Epilife ne contient pas de sérum et comporte une concentration plus faible en ions calcium (0.06 mM). Cette différence pourrait avoir une influence sur l'expression de la podoplanine. Pour déterminer cela, il pourrait être judicieux d'ajouter du sérum ou du calcium dans le milieu Epilife et d'analyser le profil d'expression de la podoplanine dans les cellules, vu l'effet important de ces deux facteurs sur la différenciation des kératinocytes (Borowiec, Delcourt et al. 2013). Une seconde explication résiderait dans la grande variabilité des profils d'expression dans les cellules A431 cultivées dans le milieu Epilife. Cette variabilité pourrait s'expliquer par les difficultés rencontrées lors de la culture des cellules dans ce milieu.

Concernant le rôle de la podoplanine dans les kératinocytes cancéreux, il est difficile d'élaborer des hypothèses sur base du profil d'expression, étant donné les divergences décrites ci-dessus. Cependant, son implication dans le développement de carcinomes spinocellulaires a été suggérée à plusieurs reprises dans la littérature. L'équipe de Tsuneki a démontré que la podoplanine modulait l'adhésion cellulaire dans des lignées cellulaires de carcinomes spinocellulaires en interagissant notamment avec CD44 (Tsuneki, Yamazaki et al. 2013). Atsumi et ses collègues ont, quant à eux, démontré que la podoplanine intervenait dans la tumorigénèse. En effet, l'injection à des souris de cellules A431 exprimant la podoplanine





entraîne le développement de tumeurs, contrairement à l'injection de cellules n'exprimant pas la podoplanine. De plus il semblerait que les cellules A431 qui expriment la podoplanine possèdent des propriétés de cellules souches, car elles sont capables de générer des cellules podoplanine-positives ou podoplanine-négatives, alors que les cellules qui au départ n'expriment pas la podoplanine ne génèrent que des cellules podoplanine-négatives (Atsumi, Ishii et al. 2008).

La podoplanine semble donc intervenir dans la tumorigenèse. Outre cette implication possible, il a été observé que cette protéine était également exprimée dans d'autres pathologies liées à un processus inflammatoire important comme le psoriasis et l'arthrite rhumatoïde. En effet, la podoplanine est présente dans des tissus synoviaux de patients atteints d'arthrite rhumatoïde au niveau des cellules épithéliales, avec une expression plus importante dans les zones d'hyperplasie où l'architecture du tissu est perturbée. La podoplanine est aussi détectée dans des cultures de synoviocytes au niveau des fibres de stress produites par les cellules lors de l'inflammation. De plus, l'ajout de cytokines pro-inflammatoires augmente l'expression de la podoplanine (Ekwall, Eisler et al. 2011). Il pourrait donc y avoir une relation entre l'inflammation et la podoplanine. Une autre équipe a observé une expression de la podoplanine dans le psoriasis au niveau de l'épiderme lésionnel (Honma, Minami-Hori et al. 2012). La podoplanine est exprimée dans des kératinocytes suite à une blessure et interviendrait dans la migration cellulaire pour permettre la réparation de la blessure (J Asai 2012).

L'étude du rôle de la podoplanine dans le contexte du carcinome spinocellulaire semble donc intéressante. Pour pouvoir réaliser cette étude, nous avons élaboré un modèle de carcinome spinocellulaire au sein d'un environnement épidermique.

## **2 Élaboration d'un modèle de carcinome spinocellulaire au sein d'un environnement épidermique**

Les études sur les mécanismes impliqués dans le développement du carcinome spinocellulaire sont importantes du fait de l'impact négatif de ce type de cancer sur la population. En effet, ce cancer est capable de donner des métastases, rendant le pronostic vital très défavorable. Les modèles animaux permettent ces études des mécanismes impliqués dans la tumorigenèse. En effet, de nombreux modèles, notamment des souris transgéniques ou knockout, existent déjà pour étudier des facteurs impliqués dans les mécanismes de développement du carcinome. Cependant, les règles éthiques actuelles prônent une réduction et un remplacement de l'utilisation des animaux de laboratoire. C'est pourquoi le modèle élaboré lors de ce travail présente l'avantage d'être une technique d'étude *in vitro* du comportement des cellules cancéreuses.

Nous avons établi deux modèles de coculture : la monocouche et le tissu reconstruit. Grâce à ces modèles, il serait possible de visualiser et d'étudier le comportement des cellules cancéreuses présentes dans ce tissu. Chaque modèle présente des avantages : le modèle en monocouche permet d'obtenir une situation où les cellules cancéreuses sont au voisinage des kératinocytes normaux. Il permet également de visualiser les cellules vivantes : par microscopie à contraste de phase pour les deux types cellulaires, et par microscopie à



fluorescence pour identifier les cellules A431 qui expriment la GFP. De plus, ce modèle permet une facilité et une rapidité d'utilisation. Cependant, ce modèle est éloigné de la situation *in vivo*, puisqu'il est en deux dimensions et que les cellules sont dans des conditions de culture immergées. Le modèle en épiderme reconstruit permet d'obtenir une situation se rapprochant de la condition *in vivo* car les cellules cancéreuses sont placées dans un contexte tissulaire. Cependant la visualisation, contrairement au modèle en monocouche, ne peut être effectuée sur des cellules vivantes. Il n'y a donc pas de suivi possible de l'évolution de la culture.

À l'heure actuelle, l'intérêt pour le développement de ce type de modèle d'étude *in vitro* est grandissant. L'équipe de Brauchle *et al.* a élaboré différents modèles en utilisant une autre lignée de cellules de carcinomes spinocellulaires (lignée cellulaire SCC-25). Le premier modèle est un tissu reconstruit constitué de kératinocytes normaux et de cellules SCC-25. L'inconvénient de leur modèle est qu'il est difficile d'y distinguer clairement les cellules cancéreuses des kératinocytes normaux. En effet, pour analyser la proportion de cellules cancéreuses dans l'épiderme reconstruit, il est nécessaire d'utiliser une technique de spectrométrie. L'équipe a ensuite établi un second modèle où l'épiderme, constitué des kératinocytes normaux et de cellules SCC-25, est cultivé sur un derme équivalent, constitué de fibroblastes. Ce modèle présente l'avantage d'être encore plus représentatif de la situation *in vivo*. En effet, une formation de perles cornées prend place au niveau de l'épiderme, ce qui est typique du carcinome spinocellulaire. Il est également possible, grâce à ce second modèle d'étudier l'invasion cellulaire des cellules SCC-25 dans le derme (Brauchle, Johannsen et al. 2013).

Une autre équipe a également développé des modèles de tissu reconstruit. Le premier est constitué uniquement de kératinocytes cancéreux issus de deux lignées de carcinomes spinocellulaires (SCC-12B2 et SCC-13) cultivés sur un derme équivalent. Dans un second modèle, un explant tissulaire obtenu à partir de carcinome spinocellulaire est cultivé directement sur un derme équivalent, avec une formation de « niches squameuses » au niveau du derme. Cependant, dans ce cas-ci, l'identification des cellules cancéreuses, repose sur la détection de marqueurs spécifiques par immunohistochimie (Commandeur, de Gruijl et al. 2009).

Le modèle élaboré lors de ce travail présente l'avantage de permettre la visualisation directe des cellules cancéreuses, grâce à la GFP. Il pourrait être intéressant, tout comme l'ont fait les autres équipes, de cultiver l'épiderme sur un derme équivalent. Ce modèle permettrait alors d'analyser le profil migratoire des cellules cancéreuses et, grâce à la GFP, de déterminer si les cellules cancéreuses sont capables d'envahir le derme.

L'objectif final est l'utilisation de ce modèle pour l'étude du rôle de la podoplanine dans les kératinocytes cancéreux. Préalablement, nous avons voulu valider et évaluer les potentialités du modèle. Pour cela, nous voulions moduler l'environnement extracellulaire pour induire une modification de la taille de la population des cellules A431. Pour ce faire, nous avons analysé l'influence de l'EGF sur cette population, car les cellules A431 sont des cellules surexprimant le récepteur de l'EGF et supposées sensibles à ce facteur. Suite aux expériences réalisées, nous avons observé que les cellules A431 présentent une autophosphorylation du récepteur de l'EGF. De plus, l'EGF n'induit pas de modification de la taille de la population cellulaire, contrairement à nos attentes.

Plusieurs études ont démontré que des concentrations faibles d'EGF (de l'ordre de 0.01 nM) induisent une augmentation de la prolifération cellulaire, tandis que des concentrations plus élevées (de l'ordre de 10 nM) induisent un arrêt du cycle cellulaire, et dans certains cas, une



apoptose de la cellule (Barnes 1982; Gulli, Palmer et al. 1996; Cao, Yao et al. 2000). Il semblerait donc que l'EGF aurait des effets différents sur la population cellulaire en fonction de sa concentration.

De manière contradictoire, les différentes expériences réalisées lors de ce travail nous ont montré que l'ajout d'EGF n'induit pas de modification de la taille de la population des cellules A431. La raison possible est que les cellules possèdent déjà un taux de prolifération important et qu'il est difficile de l'augmenter. De plus, les cellules A431 ont une autophosphorylation de leur récepteur de l'EGF, il est donc possible qu'elles n'aient pas besoin d'EGF exogène pour proliférer. Une caractéristique fréquente des cellules cancéreuses est qu'elles montrent une prolifération indépendante de la présence de facteurs de croissance (Hanahan and Weinberg 2012).

Comme l'addition d'EGF n'a pas montré d'effet concluant, nous avons décidé, à l'inverse, d'inhiber le récepteur de l'EGF. En effet, étant donné que les cellules A431 surexpriment le récepteur de l'EGF, il est possible que ce récepteur soit impliqué dans leur survie et leur prolifération. C'est pourquoi nous avons étudié l'effet d'inhibiteurs de son activité ou de la liaison du ligand sur la population des cellules A431. Nous avons étudié trois types d'inhibiteurs : AG1478, PD153035 et LA1. Les premiers résultats nous ont montré que l'effet de l'inhibiteur AG1478 est une réduction de la taille de la population cellulaire. Ce résultat concorde avec des résultats obtenus par Kim et ses collègues. En effet, suite à l'incubation d'AG1478 sur la population de cellules A431, ils ont observé une diminution de la population (Kim, Song et al. 2009). Cependant, les résultats du test MTT indiquent que l'inhibiteur avait plutôt un effet cytotoxique. Cependant, lors du comptage cellulaire cet effet n'était pas présent et nous avons observé un effet cytostatique. Toutefois, ces résultats devraient être confirmés.

Nous avons ensuite réalisé des cocultures pour y analyser l'effet de l'inhibiteur sur la proportion des cellules A431. Les résultats ont montré que l'inhibiteur reste sans effet sur la proportion des cellules A431. Nous n'avons donc pas pu obtenir de situation où la population des cellules A431 était modifiée par les conditions testées.

### 3 Perspectives

Ce travail avait pour objectif d'élaborer un modèle de carcinome spinocellulaire au sein d'un environnement épidermique dans le but d'y étudier le rôle de la podoplanine. Nous sommes parvenus à établir deux modèles de cocultures dans lesquels nous pouvons visualiser de manière claire les cellules cancéreuses, rendues fluorescentes par la GFP. Nous avons commencé à évaluer les potentialités du modèle en étudiant l'influence de l'EGF, puis des inhibiteurs du récepteur de l'EGF sur la population cellulaire. Cependant, malgré la nécessité de répéter les expériences, ce choix ne paraît pas concluant. Il serait alors utile de se focaliser sur d'autres facteurs capables d'avoir un impact sur la population de cellules cancéreuses sans affecter celle des cellules normales, par exemple, des agents chimiothérapeutiques dont les effets ont déjà été démontrés.

Pour finaliser la caractérisation de ce modèle, nous pourrions analyser le profil de différenciation par immunomarquage des différents marqueurs de différenciation sur les



modèles en épidermes reconstruits et comparer avec le profil d'expression *in vivo* sur des carcinomes spinocellulaires.

Une fois les mises au point terminées, ce modèle pourra être utilisé pour évaluer le rôle de la podoplanine. Premièrement, il faudra analyser l'expression de la podoplanine dans les cellules cancéreuses présentes dans le modèle. Par la suite, en fonction du taux d'expression, le gène de la podoplanine sera invalidé ou surexprimé dans les cellules A431 respectivement par l'utilisation de shRNA ou en utilisant le cDNA derrière un promoteur fort. Des modèles de monocouche et d'épiderme reconstruit pourront alors être élaborés en ensemençant les kératinocytes normaux avec les cellules A431 GFP-positives podoplanine-négatives ou positives, et nous pourrons étudier le phénotype des cellules notamment du point de vue de leur prolifération. Par ailleurs, il a été démontré que la podoplanine pourrait intervenir dans la transition épithélio-mésenchymateuse. Afin d'étudier cette hypothèse, des marquages de facteurs épithéliaux comme l'E-cadhérine pourront être réalisés sur les épidermes reconstruits comportant les cellules A431 où l'expression est invalidée ou surexprimée et une comparaison pourra être établie avec les épidermes reconstruits où la podoplanine est exprimée.

Outre l'étude du rôle de la podoplanine dans les kératinocytes cancéreux, ce modèle pourrait avoir d'autres utilités, dont notamment l'étude du rôle de l'inflammation sur le phénotype des cellules cancéreuses. Il a en effet été démontré que l'inflammation chronique pouvait être impliquée dans le développement tumoral en induisant l'activation de facteurs responsables de la prolifération cellulaire (Nickoloff, Ben-Neriah et al. 2005). Il serait donc intéressant d'étudier le comportement des kératinocytes cancéreux dans un environnement inflammatoire, au sein d'un tissu épidermique reconstruit.

Pour des expériences futures, ce modèle pourrait également être utilisé pour étudier les mécanismes et les voies de signalisation impliqués dans le développement tumoral, mais également pour étudier les effets de thérapies contre les cellules cancéreuses ou analyser l'effet d'agents chimiothérapeutiques sur les cellules cancéreuses en présence des kératinocytes normaux.





# **Bibliographie**



- Alam, M. and D. Ratner (2001). "Cutaneous squamous-cell carcinoma." N Engl J Med **344**(13): 975-83.
- Astarita, J. L., S. E. Acton, et al. (2012). "Podoplanin: emerging functions in development, the immune system, and cancer." Front Immunol **3**: 283.
- Atsumi, N., G. Ishii, et al. (2008). "Podoplanin, a novel marker of tumor-initiating cells in human squamous cell carcinoma A431." Biochem Biophys Res Commun **373**(1): 36-41.
- Barnes, D. W. (1982). "Epidermal growth factor inhibits growth of A431 human epidermoid carcinoma in serum-free cell culture." J Cell Biol **93**(1): 1-4.
- Bikle, D. D., Z. Xie, et al. (2012). "Calcium regulation of keratinocyte differentiation." Expert Rev Endocrinol Metab **7**(4): 461-472.
- Blumenberg, M. (2013). "Profiling and metaanalysis of epidermal keratinocytes responses to epidermal growth factor." BMC Genomics **14**: 85.
- Borowiec, A. S., P. Delcourt, et al. (2013). "Optimal differentiation of in vitro keratinocytes requires multifactorial external control." PLoS One **8**(10): e77507.
- Brauchle, E., H. Johannsen, et al. (2013). "Design and analysis of a squamous cell carcinoma in vitro model system." Biomaterials **34**(30): 7401-7.
- Breiteneder-Geleff, S., K. Matsui, et al. (1997). "Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis." Am J Pathol **151**(4): 1141-52.
- Cao, L., Y. Yao, et al. (2000). "Epidermal growth factor induces cell cycle arrest and apoptosis of squamous carcinoma cells through reduction of cell adhesion." J Cell Biochem **77**(4): 569-83.
- Commandeur, S., F. R. de Gruijl, et al. (2009). "An in vitro three-dimensional model of primary human cutaneous squamous cell carcinoma." Exp Dermatol **18**(10): 849-56.
- Commandeur, S., V. van Drongelen, et al. (2012). "Epidermal growth factor receptor activation and inhibition in 3D in vitro models of normal skin and human cutaneous squamous cell carcinoma." Cancer Sci **103**(12): 2120-6.
- Eckert, R. L. and E. A. Rorke (1989). "Molecular biology of keratinocyte differentiation." Environ Health Perspect **80**: 109-16.
- Ekwall, A. K., T. Eisler, et al. (2011). "The tumour-associated glycoprotein podoplanin is expressed in fibroblast-like synoviocytes of the hyperplastic synovial lining layer in rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther **13**(2): R40.
- Fitzpatrick, A. (2003). Fitzpatrick's Dermatology In General Medicine.



- Frankart, A., J. Malaisse, et al. (2012). "Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air-liquid interface." Exp Dermatol **21**(11): 871-5.
- Fujii, M., M. Honma, et al. (2013). "Intercellular contact augments epidermal growth factor receptor (EGFR) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)-activation which increases podoplanin-expression in order to promote squamous cell carcinoma motility." Cell Signal **25**(4): 760-5.
- Fujita, N. and S. Takagi (2012). "The impact of Aggrus/podoplanin on platelet aggregation and tumour metastasis." J Biochem **152**(5): 407-13.
- Gulli, L. F., K. C. Palmer, et al. (1996). "Epidermal growth factor-induced apoptosis in A431 cells can be reversed by reducing the tyrosine kinase activity." Cell Growth Differ **7**(2): 173-8.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2012). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-74.
- Honma, M., M. Minami-Hori, et al. (2012). "Podoplanin expression in wound and hyperproliferative psoriatic epidermis: regulation by TGF-beta and STAT-3 activating cytokines, IFN-gamma, IL-6, and IL-22." J Dermatol Sci **65**(2): 134-40.
- Hussein, M. R. (2005). "Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms." J Cutan Pathol **32**(3): 191-205.
- J Asai, S. H., J Sakabe, T Kishida, O Mazda, T Urano, K Suzuki-Inoue, Y Tokura and N Kato (2012). "Regulation of keratinocyte migration by podoplanin during cutaneous wound healing in mice." Journal of Investigative Dermatology **132**: S7-S13.
- Kaneko, M. K., Y. Kato, et al. (2006). "Conservation of a platelet activating domain of Aggrus/podoplanin as a platelet aggregation-inducing factor." Gene **378**: 52-7.
- Kim, D. J., J. M. Angel, et al. (2009). "Constitutive activation and targeted disruption of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) in mouse epidermis reveal its critical role in UVB-induced skin carcinogenesis." Oncogene **28**(7): 950-60.
- Kim, S. H., Y. C. Song, et al. (2009). "Effect of epidermal growth factor receptor inhibitor alone and in combination with cisplatin on growth of vulvar cancer cells." Ann N Y Acad Sci **1171**: 642-8.
- Krishnan, H., J. A. Ochoa-Alvarez, et al. (2013). "Serines in the intracellular tail of podoplanin (PDPN) regulate cell motility." J Biol Chem **288**(17): 12215-21.
- Lapouge, G., K. K. Youssef, et al. (2011). "Identifying the cellular origin of squamous skin tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(18): 7431-6.
- Le, T. A., T. Takai, et al. (2009). "Inhibition of double-stranded RNA-induced TSLP in human keratinocytes by glucocorticoids." Allergy **64**(8): 1231-2.



- Lowe, K. L., L. Navarro-Nunez, et al. (2012). "Platelet CLEC-2 and podoplanin in cancer metastasis." Thromb Res **129 Suppl 1**: S30-7.
- Mahtab, E. A., R. Vicente-Steijn, et al. (2009). "Podoplanin deficient mice show a RhoA-related hypoplasia of the sinus venosus myocardium including the sinoatrial node." Dev Dyn **238**(1): 183-93.
- Mahtab, E. A., M. C. Wijffels, et al. (2008). "Cardiac malformations and myocardial abnormalities in podoplanin knockout mouse embryos: Correlation with abnormal epicardial development." Dev Dyn **237**(3): 847-57.
- Markey, A. C. (1995). "Etiology and pathogenesis of squamous cell carcinoma." Clin Dermatol **13**(6): 537-43.
- Martin-Villar, E., B. Fernandez-Munoz, et al. (2010). "Podoplanin associates with CD44 to promote directional cell migration." Mol Biol Cell **21**(24): 4387-99.
- Martin-Villar, E., D. Megias, et al. (2006). "Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition." J Cell Sci **119**(Pt 21): 4541-53.
- Martin-Villar, E., F. G. Scholl, et al. (2005). "Characterization of human PA2.26 antigen (T1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas." Int J Cancer **113**(6): 899-910.
- Matsumoto, T., J. Jiang, et al. (2002). "Overexpression of a constitutively active form of c-src in skin epidermis increases sensitivity to tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate." Mol Carcinog **33**(3): 146-55.
- Matsumoto, T., J. Jiang, et al. (2003). "Targeted expression of c-Src in epidermal basal cells leads to enhanced skin tumor promotion, malignant progression, and metastasis." Cancer Res **63**(16): 4819-28.
- Miller, A. J. and M. C. Mihm, Jr. (2006). "Melanoma." N Engl J Med **355**(1): 51-65.
- Miller, S. J. (1995). "Etiology and pathogenesis of basal cell carcinoma." Clin Dermatol **13**(6): 527-36.
- Minner, F., F. Herphelin, et al. (2010). "Study of epidermal differentiation in human keratinocytes cultured in autocrine conditions." Methods Mol Biol **585**: 71-82.
- Nickoloff, B. J., Y. Ben-Neriah, et al. (2005). "Inflammation and cancer: is the link as simple as we think?" J Invest Dermatol **124**(6): x-xiv.
- Pittelkow, M. R., P. W. Cook, et al. (1993). "Autonomous growth of human keratinocytes requires epidermal growth factor receptor occupancy." Cell Growth Differ **4**(6): 513-21.
- Poumay, Y. and A. Coquette (2007). "Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research." Arch Dermatol Res **298**(8): 361-9.





- Poumay, Y., F. Dupont, et al. (2004). "A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies." Arch Dermatol Res **296**(5): 203-11.
- Poumay, Y. and M. R. Pittelkow (1995). "Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins." J Invest Dermatol **104**(2): 271-6.
- Raica, M., A. M. Cimpean, et al. (2008). "The role of podoplanin in tumor progression and metastasis." Anticancer Res **28**(5B): 2997-3006.
- Ratushny, V., M. D. Gober, et al. (2012). "From keratinocyte to cancer: the pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma." J Clin Invest **122**(2): 464-72.
- Rubin, A. I., E. H. Chen, et al. (2005). "Basal-cell carcinoma." N Engl J Med **353**(21): 2262-9.
- Schacht, V., S. S. Dadras, et al. (2005). "Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors." Am J Pathol **166**(3): 913-21.
- Schacht, V., M. I. Ramirez, et al. (2003). "T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema." EMBO J **22**(14): 3546-56.
- Scholl, F. G., C. Gamallo, et al. (2000). "Ectopic expression of PA2.26 antigen in epidermal keratinocytes leads to destabilization of adherens junctions and malignant progression." Lab Invest **80**(11): 1749-59.
- Shimada, Y., G. Ishii, et al. (2009). "Expression of podoplanin, CD44, and p63 in squamous cell carcinoma of the lung." Cancer Sci **100**(11): 2054-9.
- Stellato, C. (2007). "Glucocorticoid actions on airway epithelial responses in immunity: functional outcomes and molecular targets." J Allergy Clin Immunol **120**(6): 1247-63; quiz 1264-5.
- Stevens, L., Young (2004). anatomie pathologique.
- Talmadge, J. E. and I. J. Fidler (2010). "AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective." Cancer Res **70**(14): 5649-69.
- Tarutani, M., T. Cai, et al. (2003). "Inducible activation of Ras and Raf in adult epidermis." Cancer Res **63**(2): 319-23.
- Toll, A., E. Masferrer, et al. (2013). "Epithelial to mesenchymal transition markers are associated with an increased metastatic risk in primary cutaneous squamous cell carcinomas but are attenuated in lymph node metastases." J Dermatol Sci **72**(2): 93-102.
- Tomic-Canic, M., M. Komine, et al. (1998). "Epidermal signal transduction and transcription factor activation in activated keratinocytes." J Dermatol Sci **17**(3): 167-81.



- Tsuneki, M., M. Yamazaki, et al. (2013). "Podoplanin-mediated cell adhesion through extracellular matrix in oral squamous cell carcinoma." Lab Invest **93**(8): 921-32.
- Wetterwald, A., W. Hoffstetter, et al. (1996). "Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes." Bone **18**(2): 125-32.
- Wicki, A. and G. Christofori (2007). "The potential role of podoplanin in tumour invasion." Br J Cancer **96**(1): 1-5.
- Wicki, A., F. Lehenbre, et al. (2006). "Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton." Cancer Cell **9**(4): 261-72.
- Zhao, L., W. Li, et al. (2009). "Srcasm inhibits Fyn-induced cutaneous carcinogenesis with modulation of Notch1 and p53." Cancer Res **69**(24): 9439-47.